

LUÍSA MOTA DA SILVA

ATIVIDADE GASTROPROTETORA E EFEITO SOBRE A FUNÇÃO MOTORA
GÁSTRICA DE RATAS DAS FOLHAS DE *Arctium lappa* L. (BARDANA): UM ESTUDO
SOB CONDIÇÕES NORMAIS E AUMENTADAS DE GLICEMIA.

CURITIBA

2014

LUÍSA MOTA DA SILVA

ATIVIDADE GASTROPROTETORA E EFEITO SOBRE A FUNÇÃO MOTORA
GÁSTRICA DE RATAS DAS FOLHAS DE *Arctium lappa* L. (BARDANA): UM ESTUDO
SOB CONDIÇÕES NORMAIS E AUMENTADAS DE GLICEMIA.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Paraná como requisito parcial
para a obtenção do Título de Doutor em Farmacologia.

Orientadora: Prof^a Dra. Maria Fernanda de Paula
Werner

Co-orientadora: Prof^a Dra. Maria Consuelo de A.
Marques

CURITIBA

2014

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese ao meu irmão Bruno, o nosso Nino, por ter me honrado com sua presença em minha vida e me lembrar constantemente através de seu exemplo que precisamos persistir.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida.

Aos meus pais Luzinete e Daniel pelo amor infinito e pelo exemplo de conduta.

Aos meus irmãos Bruno, Felype e Levy.

Ao meu companheiro Julio pela paciência e dedicação.

Ao meu filho Luis pela alegria em meus dias.

Aos eternos melhores amigos Tatiane e Rafael por me lembrarem quem sou a qualquer momento que precisar.

Tenho muito orgulho de ter cada um de vocês em minha vida.

As Prof^{as}. Dras. Maria Fernanda de Paula Werner e Cristiane H. Baggio por ter me recebido em seu grupo de pesquisa, pelo apoio financeiro ao projeto e por toda atenção a mim dispensada.

Ao Prof^o Dr. Thales Ricardo Cipriani e Dr. Lauro de Souza pelo ótimo suporte com as análises fitoquímicas.

A Prof^a. Dra. Maria Consuelo de Andrade Marques por ter despertado em mim o interesse pelo mundo acadêmico desde antes do mestrado.

A Prof^a. Dra. Débora Santana, exemplo de profissional que muito admiro.

Aos Prof^o Dr. José Eduardo da Silva-Santos, Prof^a. Dra. Clélia Hiruma Lima, Dra. Sandra Crestani, Dra. Flavia Bonnamim e Msc. Suellen Lais Vicentino pelas importantes colaborações.

Ao departamento de Farmacologia e à Universidade Federal do Paraná pela oportunidade.

A CAPES pelo apoio financeiro.

As amigas e companheiras de laboratório Alexandra, Ligia, Isabela, Daniele, Débora, Tuany, Cláudia, Larissa, Mariana e Evana pela amizade companhia cotidiana, auxílio nos experimentos e aprendizado mútuo.

As amigas e companheiras de departamento Priscila, Rita e Haissa pela amizade e cumplicidade.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho e que em algum momento fizeram parte da grande equipe que me auxiliou durante a execução deste estudo meu sincero obrigada!

“Buscamos, no outro, não a sabedoria do conselho, mas o silêncio da escuta; não a solidez do músculo, mas o colo que acolhe.”

Rubem Alves

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xvii
RESUMO.....	xxi
ABSTRACT.....	xxiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
1.1.1 <i>Arctium lappa</i> L	2
1.1.2 O estômago.....	6
1.1.2.1 Aspectos anatômicos do estômago.....	6
1.1.2.2 A secreção gástrica.....	7
1.1.2.3 Fatores de agressão e proteção da mucosa gástrica.....	11
1.1.3 Úlcera Péptica.....	14
1.1.4 Motilidade gástrica.....	16
1.1.4.1 Esvaziamento gástrico normal e alterado.....	18
1.1.5 Diabetes.....	19
1.1.5.1 Sintomas gastrointestinais associados ao <i>Diabetes mellitus</i>	21
a. Diabetes e úlcera gástrica.....	22
b. Diabetes e a motilidade gástrica.....	23
2. OBJETIVO GERAL.....	27
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1 MATERIAL BOTÂNICO.....	28
3.1.1 Preparação do extrato e frações.....	28

3.2	IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA.....	30
3.3	MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DOS ÁCIDOS DICAFOILQUÍNICO – ACETONAÇÃO.....	32
3.4	DILUIÇÃO DO EXTRATO E FRAÇÕES.....	32
3.5	DROGAS E SAIS.....	32
3.6	ANIMAIS.....	33
3.7	TESTE DE ATIVIDADES GERAIS E TOXICIDADE AGUDA.....	34
3.8	ÚLCERA GÁSTRICA AGUDA INDUZIDA POR ETANOL 98%	35
3.9	ÚLCERA GÁSTRICA AGUDA INDUZIDA POR ETANOL 98% EM RATAS PREVIAMENTE TRATADAS COM N-ETILMALEIMIDA (NEM) OU INDOMETACINA.....	35
3.10	ÚLCERA GÁSTRICA AGUDA INDUZIDA POR INDOMETACINA.....	36
3.11	QUANTIFICAÇÃO DE MUÇO ADERIDO NA MUCOSA GÁSTRICA.....	36
3.12	ÚLCERA GÁSTRICA CRÔNICA INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO 80%.....	37
3.13	ÚLCERA GÁSTRICA CRÔNICA INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO 80% EM RATAS DIABÉTICAS.....	38
3.14	AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA.....	39
	3.14.1 Avaliação histopatológica.....	39
	3.14.2 Avaliação histoquímica do conteúdo de mucinas.....	39
3.15	QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE (MPO).....	40

3.16	QUANTIFICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DOS NÍVEIS DE ATIVIDADE DA MPO.....	41
3.17	AVALIAÇÃO DE INDICADORES NÃO ENZIMÁTICOS DO ESTRESSE OXIDATIVO.....	41
3.17.1	Quantificação dos níveis de glutathiona reduzida(GSH).....	42
3.17.2	Quantificação intracelular das espécies reativas de oxigênio (EROs)	42
3.18	AVALIAÇÃO DE INDICADORES ENZIMÁTICOS DO ESTRESSE OXIDATIVO.....	43
3.18.1	Dosagem de proteínas....	43
3.18.2	Quantificação dos níveis da atividade da enzima superoxido dismutase (SOD).....	43
3.18.3	Quantificação dos níveis da atividade da enzima catalase (CAT).....	44
3.18.4	Quantificação dos níveis da atividade da enzima glutathiona-S-transferase (GST).....	44
3.18.5	Quantificação dos níveis da atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx).....	45
3.19	AVALIAÇÃO DA SECREÇÃO GÁSTRICA.....	45
3.20	QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE PÉPTICA.....	46
3.21	QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE GASTRINA.....	46
3.22	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE DA H ⁺ /K ⁺ -ATPASE.....	47
3.23	AVALIAÇÃO DO ESVAZIAMENTO GÁSTRICO.....	48
3.24	ESTÔMAGO ISOLADO DE RATO.....	50
3.24.1	Preparação do tecido.....	50

3.24.2 Protocolo experimental.....	50
3.25 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DA ENZIMA NOS-1.....	51
3.26 AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS MORFOLÓGICOS E QUANTITATIVOS DOS NEURÔNIOS DO PLEXO MIOENTÉRICO GÁSTRICO.....	52
3.27 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA FORMAÇÃO DOS PRODUTOS FINAIS DA GLICAÇÃO AVANÇADA (AGES).....	53
3.28 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE SEQUESTRADORA DO RADICAL LIVRE 2,2-DIFENIL-1-PICRIL-HIDRAZILA (DPPH).....	54
3.29 EXPRESSÃO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
4. RESULTADOS	55
4.1 IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA.....	55
4.2 TESTE GERAL DE ATIVIDADES E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA EM CAMUNDONGOS.....	61
4.3 ATIVIDADE GASTROPROTETORA.....	62
4.3.1 Efeito da administração oral do SE e frações sobre úlceras gástricas induzidas por etanol em ratas.....	62
4.3.2 Efeito da administração intraperitoneal do SE e da fração SE-AE sobre úlceras gástricas induzidas por etanol em ratas.....	64
4.3.3 Efeito da administração oral do ácido 1,3- <i>O</i> -dicafeoilquínico isolado da fração SE-AE sobre úlceras gástricas induzidas por etanol em ratas.....	65

4.3.4 Efeito da fração SE-AE sobre úlceras gástricas induzidas por etanol em ratas previamente tratadas com N-etilmaleimida (NEM) ou indometacina.....	66
4.3.5 Efeito da fração SE-AE sobre úlceras gástricas induzidas por indometacina em ratas.....	67
4.3.6 Efeito da fração SE-AE sobre os níveis de muco aderido na mucosa gástrica após a lesão induzida por etanol ou por indometacina.....	68
4.3.7 Efeito da fração SE-AE sobre os níveis de GSH gástrico após a lesão induzida por etanol ou por indometacina.....	69
4.4 ATIVIDADE CICATRIZANTE GÁSTRICA.....	70
4.4.1 Efeito da fração SE-AE sobre úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético em ratas.....	70
4.4.2 Efeito da fração SE-AE sobre os níveis de mucina após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético.....	72
4.4.3 Efeito da fração SE-AE sobre os níveis de atividade da MPO após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético	73
4.4.4 Efeito da fração SE-AE sobre os níveis de ROS e GSH após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético.....	74
4.5 ATIVIDADE ANTISECRETORA.....	75
4.5.1 Efeito da fração SE-AE na secreção ácida gástrica basal e na atividade péptica.....	75

4.5.2	Efeito da fração SE-AE nos níveis séricos de gastrina.....	76
4.5.3	Efeito <i>in vitro</i> da fração SE-AE na atividade da H^+/K^+ -ATPase.....	78
4.6	ATIVIDADE SEQÜESTRADORA DE RADICAIS LIVRES (DPPH) E ATIVIDADE INIBITÓRIA DA FORMAÇÃO NÃO ENZIMÁTICA DE PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (AGE) DA FRAÇÃO SE-AE <i>in vitro</i>	79
4.7	ATIVIDADE CICATRIZANTE GÁSTRICA EM ANIMAIS DIABÉTICOS.....	80
4.7.1	Efeito da fração SE-AE sobre úlceras gástricas induzidas por ácido acético em ratas diabéticas.....	80
4.7.2	Efeito da fração SE-AE sobre os níveis de mucina após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético em ratas diabéticas.....	84
4.7.3	Efeito da fração SE-AE sobre os níveis de MPO após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético em ratas diabéticas.....	85
4.7.4	Efeito da fração SE-AE sobre os níveis de ROS e GSH após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético em ratas diabéticas.....	86
4.7.5	Efeito da fração SE-AE sobre a atividade das enzimas SOD, CAT, GST e GPx após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético em animais diabéticos.....	87
4.8	EFEITO NA FUNÇÃO MOTORA GÁSTRICA.....	89

4.8.1 Efeito da administração da fração SE-AE sobre o esvaziamento gástrico em ratas diabéticas.....	89
4.8.2 Efeito da administração da fração SE-AE sobre as contrações evocadas pelo KCl (40mM) no fundo gástrico e piloro de ratas diabéticas.....	93
4.8.3 Efeito da administração da fração SE-AE sobre as contrações evocadas por acetilcolina (Ach) no fundo gástrico e piloro de ratas diabéticas.....	94
4.8.4 Efeito da administração da fração SE-AE sobre relaxamento evocado pelo nitroprussiato de sódio (SNP) no fundo gástrico e piloro de ratas diabéticas.....	97
4.8.5 Efeito da administração da fração SE-AE sobre relaxamento evocado pela estimulação elétrica no fundo gástrico ratas diabéticas.....	100
4.8.6 Efeito da administração da fração SE-AE sobre os níveis de expressão da NOS1 no corpo gástrico de ratas diabéticas.....	101
4.8.7 Efeito da administração da fração SE-AE sobre os neurônios mioentéricos NADPH-diaforase positivos da região gástrica glandular (corpo e antro) de ratas diabéticas.....	102
5. DISCUSSÃO.....	107
6. CONCLUSÃO.....	129
7. BIBLIOGRAFIA.....	131
8. APÊNDICES.....	155

8.1	APÊNDICE A: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS PRINCIPAIS RESULTADOS OBTIDOS NOS ENSAIOS DE GASTROPROTEÇÃO.....	155
8.2	APÊNDICE B: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS PRINCIPAIS RESULTADOS OBTIDOS NOS ENSAIOS DE CICATRIZAÇÃO GÁSTRICA.....	156
8.3	APÊNDICE C: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS PRINCIPAIS RESULTADOS OBTIDOS NOS ENSAIOS DE MOTILIDADE GÁSTRICA.....	157

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. <i>Arctium lappa</i> L.....	3
FIGURA 2: Regiões anatômicas do estômago.....	6
FIGURA 3: Fases do controle da secreção gástrica.....	9
FIGURA 4: A célula parietal.....	10
FIGURA 5: Divisão funcional do estômago.....	17
FIGURA 6: Fluxograma de obtenção do sobrenadante etanólico (SE- Painei A) e de obtenção das diferentes frações (Painei B).....	29
FIGURA 7: Cromatograma UHPLC-PDA (200 - 400 nm) do extrato SE (A) e de um extrato de referência de <i>Ilex paraguariensis</i> (B).....	56
FIGURA 8: Comparação por UHPLC-PDA (325 nm) da fração SE-AE (A) e SE-B (B).....	57
FIGURA 9: Comparação entre o original (A) e o derivado isopropilideno (B) do ácido 1,3- <i>O</i> -dicafeoilquínico por UHPLC-MS.....	58
FIGURA 10: Análise por RMN do pico 23 purificado.....	59
FIGURA 11: Fórmula estrutural do ácido 1,3- <i>O</i> -dicafeoilquínico (A) e reação de acetalação do ácido 1,3- <i>O</i> -dicafeoilquínico com formação do derivado 4,5- <i>O</i> -isopropilideno.....	61
FIGURA 12: Efeito da administração oral do extrato SE e de suas frações sobre as lesões gástricas induzidas por etanol.....	63

FIGURA 13: Efeito da administração intraperitoneal do extrato SE e da fração SE-AE sobre as lesões gástricas induzidas por etanol.....	64
FIGURA 14: Efeito da administração oral do ácido 1,3-dicafeoilquínico isolado da fração SE-AE sobre as lesões gástricas induzidas por etanol.....	65
FIGURA 15: Efeito da administração oral da fração SE-AE sobre as lesões gástricas induzidas por etanol em ratas previamente tratadas com NEM ou indometacina.....	66
FIGURA 16: Efeito da administração oral da fração SE-AE sobre as lesões gástricas induzidas por indometacina (80 mg/kg, v.o).....	67
FIGURA 17: Efeito da administração oral da fração SE-AE sobre os níveis de muco gástrico após lesões gástricas induzidas por etanol ou indometacina (80 mg/kg, v.o).....	68
FIGURA 18: Efeito da administração oral da fração SE-AE sobre os níveis de GSH após lesões gástricas induzidas por etanol ou indometacina (80 mg/kg, v.o).....	69
FIGURA 19: Efeito da administração oral da fração SE-AE sobre as lesões gástricas induzidas por ácido acético.....	70
FIGURA 20: Análise macroscópica (Painéis A, C, E) e microscópica (B, D,F) das úlceras crônicas gástricas induzida por ácido acético em ratas.....	71
FIGURA 21: Avaliação dos níveis de mucina pelo método histoquímico de PAS das úlceras crônicas induzida por ácido acético 80% em ratas.....	72
FIGURA 22: Efeito da fração SE-AE sobre a atividade da MPO.....	73
FIGURA 23: Efeito da administração oral da fração SE-AE sobre os níveis de GSH (Painel A) e ROS (Painel B).....	74

FIGURA 24: Efeito da administração oral da fração SE-AE sobre os níveis séricos de gastrina em ratas não ulceradas (Painel A) e ulceradas (Painel B).....	77
FIGURA 25: Atividade seqüestradora de radicais livres (Painel A) e atividade inibitória da formação não enzimática de AGEs (Painel B) da fração SE-AE <i>in vitro</i>	79
FIGURA 26: Avaliação temporal da extensão das lesões gástricas induzidas por ácido acético em ratas diabéticas.....	80
FIGURA 27: Efeito da administração oral da fração SE-AE sobre as úlceras crônicas induzidas por ácido acético 80% em ratas diabéticas.....	81
FIGURA 28: Análise macroscópica (Painéis A, C, E e G) e microscópica (B, D,F e H) das úlceras crônicas gástricas induzida por ácido acético em ratas diabéticas.....	82
FIGURA 29: Avaliação dos níveis de mucina pelo método histoquímico de PAS das úlceras crônicas induzida por ácido acético 80% em ratas diabéticas.....	85
FIGURA 30: Efeito da administração oral da fração SE-AE sobre a atividade da MPO da mucosa gástrica em ratas diabéticas.....	86
FIGURA 31: Efeito da administração oral da fração SE-AE sobre os níveis de ROS (Painel A) e GSH (Painel B) da mucosa gástrica em ratas diabéticas.....	87
FIGURA 32: Avaliação temporal do esvaziamento gástrico em ratas diabéticas.....	90
FIGURA 33: Efeito da fração SE-AE sobre o esvaziamento gástrico em ratas diabéticas.....	91
FIGURA 34: Efeito da administração oral aguda da fração SE-AE sobre a taxa de esvaziamento gástrico de ratas normoglicêmicas (Painel A) e diabéticas (Painel B).....	92

FIGURA 35: Efeito da fração SE-AE sobre a contração evocada por KCl (40 mM) no piloro (Painel A) e fundo gástrico (Painel B) de ratas diabéticas.....	94
FIGURA 36: Efeito da fração SE-AE sobre a contração evocada por Ach (10^{-10} – 10^{-6} M) no piloro de ratas diabéticas.....	95
FIGURA 37: Efeito da fração SE-AE sobre a contração evocada por Ach (10^{-10} a 10^{-4} M) no fundo gástrico de ratas diabéticas.....	96
FIGURA 38: Efeito da fração SE-AE sobre o relaxamento evocado por SNP (10^{-10} – 10^{-5} M) no piloro de ratas diabéticas.....	98
FIGURA 39: Efeito da fração SE-AE sobre o relaxamento evocado por SNP (10^{-10} a 10^{-5} M) no fundo gástrico de ratas diabéticas.....	99
FIGURA 40: Efeito da fração SE-AE sobre o relaxamento evocado por ECC (8 HZ) no fundo gástrico de ratas diabéticas.....	100
FIGURA 41: Efeito da fração SE-AE sobre a expressão da NOS1 no corpo gástrico de ratas diabéticas.....	101
FIGURA 42: Efeito da fração SE-AE sobre os neurônios mioentéricos NADPH-diaforase positivos da região gástrica glandular (corpo e antro) de ratas diabéticas.....	103
FIGURA 43: Imagens representativas dos neurônios mioentéricos NADPH-diaforase positivos da região gástrica glandular (corpo e antro) de ratas diabéticas.....	105

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Efeito da fração SE-AE na secreção ácida gástrica basal e na atividade péptica.....	76
TABELA 2: Efeito <i>in vitro</i> da fração SE-AE na atividade da H^+/K^+ -ATPase.....	78
TABELA 3: Efeito da administração da fração SE-AE duas vezes ao dia, durante sete dias, no peso corporal, glicemia em jejum e hemoglobina glicada em ratas diabéticas expostas ao ácido acético.....	84
TABELA 4: Efeito da administração da fração SE-AE duas vezes ao dia, durante sete dias, na atividade das enzimas SOD, CAT, GST e GPx na mucosa gástrica de ratas diabéticas expostas ao ácido acético.....	89
TABELA 5: Efeito da administração da fração SE-AE uma vez ao dia, durante seis semanas, no peso corporal, glicemia em jejum e hemoglobina glicada em ratas diabéticas.....	93
TABELA 6: Área da superfície gástrica de ratas dos diferentes grupos experimentais.....	103

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Ach : acetilcolina
AINES : anti-inflamatório não esteroideal
AGEs: produtos finais da glicação avançada
Al(OH)₃: hidróxido de alumínio
AMPc : monofosfato de adenosina cíclica
ANOVA : Análise de variância
ATC : ácido tricloroacético
ATP :trifosfato de adenosina
ATR: atropina
BHT: butil hidroxi-tolueno
BH4: tetrahidrobiopterina
BSA: albumina
CAT : catalase
CCK :colecistocinina
CGRP: peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CaCl₂: cloreto de cálcio
CaCO₃: carbonato de cálcio
CDNB: 1-cloro, 2,4-dinitrobenzeno
Cl⁻: cloreto
CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência
CO₂ : gás carbônico
COX: enzima cicloxigenase
DCFH-DA: 2',7'-diclorfluoresceína-diacetato
DL₅₀: dose letal 50%
DM: diabetes mellitus
DMT1: diabetes mellitus tipo 1
DMT2: diabetes mellitus tipo 2
DMSO :dimetil-sulfóxido
DNA: Ácido desoxirribonucléico
D.O.: densidade ótica
DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

DTNB: ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)

D2: receptor domaminérgico subtipo 2

ECL : células enterocromafins

EDTA : ácido etilenodiaminotetracético

EEC: estimulação elétrica de campo

EGF: fator de crescimento epidermal

EP1 : receptor de prostaglandina subtipo 1

EP2 : receptor de prostaglandina subtipo 2

EP3 : receptor de prostaglandina subtipo 3

EROs: espécies reativas de oxigênio

ESI-MS: Ionização por eletrospray- espectrometria de massa

Eq: equivalente-grama

GNT: guanetidina

GLP-1: peptídeo semelhante ao glucagon

GPx : glutationala peroxidase

GR : glutationala redutase

GSH : glutationala reduzida

GSSH : glutationala oxidada

GST : glutationala-S-transferase

H⁺: próton ou íon hidrogênio

H⁺/ K⁺ATPase : hidrogênio, potássio adenosina trifosfatase

H2 : receptor de histamina subtipo 2

HbA₁: hemoglobina glicada

H₂O-MeOH: água - metanol

H₂O₂ : peróxido de hidrogênio

HCl : ácido clorídrico

HCO₃⁻: íon bicarbonato

H₂CO₃: ácido carbônico

HE: hematoxilina e eosina

HZ: hertz

HIV : vírus da imunodeficiência humana

HGF: fator de crescimento do hepatócito

HSP-70: proteína do choque térmico 70

HTAB: hexadeciltrimetilamônio
ICC: células intersticiais de Cajal
IC₅₀: concentração inibitória 50%
Id: via intraduodenal
IDF: federação internacional de diabetes
IL : interleucina
ip : via intraperitoneal
KCl : cloreto de potássio
L-NAME: N- ω -nitro-L-arginina metil éster
LPS : lipopolissacarídeo de membrana bacteriana
M: Molar
M1 : receptor muscarínico subtipo 1
M3 : receptor muscarínico subtipo 3
MgCl₂: cloreto de magnésio
Mg(OH)₂ : hidróxido de magnésio
MgSO₄: sulfato de magnésio
MPO : mieloperoxidase
NaCl : cloreto de sódio
NaDPH : nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NaOH : hidróxido de sódio
NaH₂CO₃ : bicarbonato de sódio
NaH₂PO₄ : dihidrogeno fosfato de sódio
NBT: nitroazul de tetrazolio
NEM: N-etilmaleimida
NMR: ressonância magnética nuclear
NO: óxido nítrico
NOD: camundongo diabético não-obeso
NOS 1: óxido nítrico sintase neuronal
NP-SH: grupos sulfidrílicos não-proteicos
O₂⁻: ânion superóxido
OH⁻ : hidroxila
PAS: ácido periódico de Schiff
pH : potencial hidrogeniônico

PGs: prostaglandinas
PGE₂: prostaglandina E 2
PGI: prostaciclina
Pi: fosfato inorgânico
RPM: rotação por minuto
SE: solúvel em etanol
SE-A: fração aquosa
SE-AE: fração solúvel em acetato de etila
SE-EAE: fração emulsificada em acetato de etila
SE-C: fração clorofórmica
SE-B: fração butanólica
SNP: nitroprussiato de sódio
SOD : superóxido desmutase
STZ: estreptozotocina
TGF- α :fator de crescimento transformador alfa
TMB: tetrametilbenzidina
TNF- α : fator de necrose tumoral alfa
UFPR : Universidade Federal do Paraná
UV: ultravioleta
v.o : via oral
VEGF : fator de crescimento endotelial vascular
1,3-DCQ: ácido 1,3-*O*-dicafeoilquínico
1,5-DCQ: ácido 1,3-*O*-dicafeoilquínico
5-HT4: receptor serotoninérgico subtipo 4

RESUMO

Este trabalho investigou o potencial terapêutico das folhas da *Arctium lappa* na prevenção e cicatrização de úlceras gástricas em condições normais e aumentadas de glicemia, bem como nas alterações da motilidade gástrica em ratas diabéticas. Tanto a administração oral (v.o) como a intraperitoneal (i.p) do extrato solúvel em etanol (SE, DE₅₀: 3,6 mg/kg) das folhas da bardana e de sua fração solúvel em acetato de etila (SE-AE, 0,15 mg/kg) protegeu a mucosa gástrica contra úlceras induzidas por etanol P.A e a administração prévia de indometacina (10 mg/kg, i.p), visando a depleção de prostaglandinas endógenas, aboliu a atividade gastroprotetora da fração. No mesmo modelo, o ácido 1,3-O-dicafeoilquínico (57 µg/kg), composto majoritário encontrado na fração, também promoveu gastroproteção contra o etanol. Ademais, a fração SE-AE (0,15 e 1,5 mg/kg, v.o) também protegeu a mucosa gástrica exposta a indometacina. A quantificação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) e muco aderido evidenciaram que a manutenção desses fatores protetores está envolvida no efeito gastroprotetor promovido pela fração SE-AE contra etanol ou indometacina. Ademais, a fração SE-AE (1 mg/kg, v.o) acelerou a cicatrização da úlcera gástrica crônica induzida por ácido acético 80% em ratas. A investigação dos mecanismos envolvidos nesse efeito demonstrou a participação do aumento do conteúdo de mucina gástrica, GSH e gastrina sérica e da redução da atividade da mieloperoxidase (MPO) e do conteúdo de espécies reativas de oxigênio (EROs). Em continuidade, em ratas diabéticas a fração SE-AE (10 mg/kg) também acelerou a cicatrização da úlcera gástrica crônica induzida por ácido acético, através do aumento do conteúdo de mucina e de GSH, da redução da atividade MPO e do conteúdo de EROs e da restauração da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathiona-S-transferase (GST) e glutathionaperoxidase (GPx). Todavia, nesses animais, a fração SE-AE não reduziu a hiperglicemia e nem os níveis de hemoglobina glicada. Ademais, a fração SE-AE promoveu o sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e também inibiu a glicação proteica *in vitro*, atestando o efeito antioxidante e anti-glicação da fração SE-AE. Ratas diabéticas tratadas durante seis semanas com a fração SE-AE (1 mg/kg) tiveram os níveis de hemoglobina glicada reduzidos, o esvaziamento gástrico, a contração colinérgica e o relaxamento nitrérgico do fundo e do piloro normalizados, bem como a expressão da enzima NOS-1 e a densidade dos neurônios entéricos NADPH-diaforase positivos no corpo gástrico preservados. Coletivamente, esses resultados mostram que a

fração SE-AE das folhas da bardana possui atividade gastroprotetora e cicatrizante gástrica mediada pelo favorecimento de fatores protetores da mucosa gástrica como as defesas antioxidantes, o muco e as PGs. Adicionalmente, sob condições hiperglicêmicas é possível que a modulação das defesas antioxidantes e o potencial anti-glicação da fração também colaborem para sua atividade cicatrizante gástrica e para o restabelecimento da função motora gástrica de ratas diabéticas. Ademais, além do restabelecimento da resposta contrátil, a restauração do relaxamento nitrérgico de tecidos gástricos e a preservação da síntese e/ou viabilidade do óxido nítrico também estão relacionados com a atividade procinética da fração em ratas diabéticas. Entretanto, mais estudos são necessários para elucidar mais profundamente estes mecanismos e ainda outros envolvidos tanto na proteção gástrica promovida pela fração SE-AE em ratas normais e diabéticas, como no restabelecimento do esvaziamento gástrico sob condições hiperglicêmicas.

Palavras-chave: *Arctiumlappa* L., gastroproteção, cicatrização gástrica, esvaziamento gástrico, diabetes.

ABSTRACT

The therapeutic potential of the leaves of burdock (*Arctium lappa* L.) is still unexplored. Thus, this study investigated the therapeutic potential of the leaves of this plant in prevention and healing of gastric ulcer under normal and altered glycaemic conditions. In addition, the effects of burdock leaves on gastric motility of diabetic rats also were assessed. Oral (p.o) and intraperitoneal (i.p) administration of ethanol-soluble extract (SE ED₅₀: 3.6 mg/kg) from leaves of burdock and its ethyl acetate-soluble fraction (SE-AE, 0.15 mg/kg) protected the gastric mucosa against ethanol-induced ulcers. However, prior administration of indomethacin (10 mg/kg, p.o), to the depletion of endogenous prostaglandins, abolished the SE-AE gastroprotective activity. Moreover, the 1,3-*O*-dicafeoylquinic acid (57 µg/kg), major compound found in SE-AE fraction, also promoted gastroprotection against ethanol. Furthermore, the fraction SE-AE (1.5 mg/kg, p.o) also protected the gastric mucosa exposed to indomethacin (80 mg/kg, po). Maintaining the reduced glutathione (GSH) level and mucus adhered content are involved in gastroprotection promoted by the fraction against ethanol or indomethacin. In the chronic ulcer induced by acetic acid model 80%, the fraction SE-AE (1 mg/kg, po) accelerated the healing of ulcer by increasing the content of gastric mucin, GSH and serum gastrin and reduction in myeloperoxidase (MPO) activity and the content of reactive oxygen species (ROS). In diabetic rats, the fraction SE-AE (10 mg/kg, p.o) also accelerated the healing of chronic ulcers induced by acetic acid, by increasing mucin and GSH content, reduced MPO activity and content of ROS and the restoration of the activity of superoxide dismutase (SOD), glutathione-S-transferase (GST) and glutathione peroxidase (GPx), but not reduce hyperglycemia or glycated hemoglobin in these animals. Furthermore, the SE-AE fraction promoted scavenger of radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and also inhibited *in vitro* protein glycation. Additionally, diabetic rats treated by six weeks with the SE-AE fraction (1 mg/kg, p.o) had levels of glycated hemoglobin reduced and gastric emptying normalized. Cholinergic contraction and the nitric relaxation of the gastric fundus and pylorus of diabetic female rats treated with SE-AE fraction also was preserved, as well as the expression of NOS enzyme -1 and the density of NADPH-diaphorase positive enteric neurons in the gastric body. Collectively, these results show that the fraction SE-AE from leaves of burdock has gastroprotective and gastric healing activity mediated by gastric mucosal protective factors such as antioxidant defenses, mucus and PGs. Additionally, under

hyperglycemic conditions is possible that modulation of antioxidant and anti-glycation effect of the fraction also collaborate for gastric healing activity and the restoration of gastric motor function in diabetic rats. Moreover, besides the restoration of contractile response, restoring nitregeric relaxation of gastric tissues and the preservation of the synthesis and/or viability of nitric oxide are also related with prokinetic activity of SE-AE fraction in diabetic rats. However, further studies are needed to elucidate these mechanisms more deeply involved and still others both in gastric protection by fraction SE-AE in normal and diabetic rats, as in the restoration of gastric emptying under hyperglycemic conditions.

Key-words: *Arctium lappa* L., gastroprotection, gastric healing, gastric emptying, diabetes.

1. INTRODUÇÃO

As plantas são uma importante fonte de produtos biologicamente ativos, sendo um caminho promissor para a descoberta de novas drogas. Pressões evolutivas selecionaram vias metabólicas nas plantas gerando compostos de valor adaptativo, os denominados metabólitos secundários que possuem estrutura química e algumas vezes propriedades biológicas interessantes (SIMÕES *et al.*, 2004). Sendo assim, a imensa diversidade de espécies vegetais é um repositório invariável de compostos químicos incomuns (EISNER, 1992).

As plantas medicinais constituem, incontestavelmente, uma estratégia terapêutica das mais antigas no tratamento de diversas enfermidades. Até o início do século XIX a grande maioria dos medicamentos utilizados pelo homem era composta basicamente por produtos de origem natural (BARROS, 2006). Entretanto, com a ascensão da indústria farmacêutica no século XX, a terapia com fármacos sintéticos ganhou destaque em detrimento ao uso de produtos naturais (RASKIN *et al.*, 2002). Devido à ocorrência de efeitos colaterais, a ineficácia terapêutica ou ainda a dificuldade em desenvolver produtos mais eficazes, o interesse nos recursos naturais, em especial nas plantas medicinais como fonte de novos medicamentos, foi retomado e é crescente nos dias atuais (RATES, 2001).

Alguns exemplos da presença de compostos naturais ou ainda de seus derivados semi-sintéticos no arsenal terapêutico vigente incluem os alcalóides da vinca (vincristina e vinblastina) obtidos das flores da *Catharanthus roseus* G. e os derivados semi-sintéticos do diterpeno taxol, extraído das cascas de gimnospermas do gênero *Taxus*, utilizados como antitumorais (GLIGOROV e LOTZ, 2004; MOUDI *et al.*, 2013). Em especial, no que tange o tratamento de úlceras pépticas, a contribuição das plantas medicinais pode ser facilmente exemplificada pela carbenoxolona, obtida principalmente dos rizomas de *Glycyrrhiza glabra* L. (alcaçuz). Este composto promove o aumento do conteúdo de prostaglandinas na mucosa gástrica e, por conseguinte o aumento da camada de muco protetor (VELO *et al.*, 1987), sendo portanto considerado o primeiro fármaco com atividade cicatrizante gástrica através de um mecanismo independente da inibição da secreção ácida gástrica (FRANCO *et al.*, 1993).

O Brasil possui cerca de 20% do número total de espécies do planeta, e desta forma dispõe da maior biodiversidade do mundo. Apesar disso, o nosso país não se destaca no aproveitamento de seus recursos naturais na produção de fitoterápicos e nem na prospecção de moléculas bioativas como protótipos de novos fármacos. Entre os motivos para tal fato podemos citar a necessidade de um melhor planejamento nos investimentos realizados em muitos dos segmentos da cadeia produtiva de plantas medicinais que levam a pesquisa para o desenvolvimento de novos fármacos e a falta de parcerias entre universidades, centros de pesquisa e indústrias. (CALIXTO, 2001; CORRÊA JÚNIOR e SCHEFFER, 2004).

O programa de Pós-graduação do Departamento de Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR) contribui para o uso seguro de plantas medicinais e para a prospecção de moléculas bioativas, através da pesquisa científica com metodologias internacionalmente padronizadas. Os estudos realizados em nosso laboratório visam demonstrar a eficácia, segurança e o mecanismo de ação de moléculas presentes em plantas medicinais sobre o trato gastrointestinal. Nos últimos anos foram desenvolvidos diversos trabalhos objetivando elucidar a atividade anti-ulcerogênica de diferentes espécies vegetais, dentre as quais a *Arctium lappa* L., investigada neste trabalho, tem sido investigada nos últimos nove anos em nosso grupo de pesquisa.

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1 *Arctium lappa* L

Arctium lappa L (Asteraceae) (Fig. 1), conhecida popularmente como bardana, gobô, orelha grande ou erva dos tinhosos é uma planta medicinal com ampla aplicação na medicina popular (FONT QUER, 1993). Ela é originária da Europa e Ásia e está aclimatada no Brasil, crescendo de maneira espontânea nos campos, bosques e áreas rurais (LORENZI e MATOS, 2002).

A *A. lappa* é uma planta herbácea e bienal, capaz de se desenvolver em ambientes úmidos e sombreados, podendo alcançar até 1,5 m de altura (FONT QUER, 1988). Apresenta

folhas grandes, com formato oval ou lanceolado (as superiores) e peciolado, podendo alcançar 40 cm de comprimento (CASTRO, 1981; FONT QUER, 1988). As flores são rosadas ou púrpuras, e a floração ocorre no verão (CORRÊA, 1984). Os frutos, aquênio oblongo-subtrígono, possuem papilos de pêlos muito caducos, as raízes podem chegar a 1,2 m de profundidade e 1 cm de diâmetro, são carnosas, fusiformes, brancas internamente e pardas externamente (FONT QUER, 1988).

As indicações populares da bardana são amplas, sendo utilizada no tratamento de infecções, inflamações, febre, doenças dermatológicas crônicas, gota, cálculo renal, úlcera gástrica e queimaduras (CUNHA *et al.*, 2003). Geralmente é consumida na forma de infuso, decocto ou utilizada externamente na forma de emplastro (FONT QUER, 1988).



FIGURA 1: *Arctium lappa* L.

(FONTE: Adaptado de <<http://www.wildgobo.net/>>. Acesso em: 29 abr. 2014

Além da utilização popular, muitos estudos já descreveram diversas atividades biológicas para diferentes extratos de bardana. Contudo, a prevalência de estudos sobre as atividades biológicas das folhas é menor em relação às raízes ou as sementes da planta. Entre os efeitos biológicos descritos estão: a atividade antibacteriana (PEREIRA *et al.*, 2005; GENTIL *et al.*, 2006), a atividade sequestradora de radicais livres e antioxidante (LEONARD *et al.*, 2006), efeito hepatoprotetor (LIN *et al.*, 2000; LIN *et al.*, 2002) assim como efeitos antiinflamatórios em modelos de colite ulcerativa (HUANG *et al.*, 2010; DE ALMEIDA *et al.*,

2013). Além disso, muitos estudos têm demonstrado o efeito hipoglicemiante de preparações das raízes e dos frutos da bardana (MITSUO *et al.*, 2005; SILVER *et al.*, 1931; XU *et al.*, 2008).

Além de diversas atividades biológicas descritas para os extratos e frações de *A. lappa*, diversos compostos presentes nesta planta já foram identificados, incluindo metabólitos secundários como os poliacetilenos: arctinona, arctinol e arctinal (CUNHA *et al.*, 2003); os terpenóides: sesquiterpenos, arctiol, β -eudesmol e fuquinona (BURLANDO *et al.*, 2010); os ácidos fenólicos, entre os quais estão os ácidos caféico, clorogênico e a cinarina (FERRACANE *et al.*, 2010); os ácidos hidroxycinamoilquínicos presentes na raízes (LIN *et al.*, 2008; DA SILVA *et al.*, 2013); as lignanas: arctiina, arctigenina, lapaóis (LIU *et al.*, 2005; FERRACANE *et al.*, 2010) e isolapaol C, diartigenina (PARK *et al.*, 2007), matairesinol, arctignana E (FERRACANE *et al.*, 2010) e arctignana D (TEZUKA *et al.*, 2013) especificamente nas sementes; os flavonóides: quercetina, quercitrina, rutina, baicalina e luteolina (FERRACANE *et al.*, 2010); fitosteróis: β -sitosterol e estigmasterol, resinas e taninos (BURLANDO *et al.*, 2010). Adicionalmente, metabólitos primários identificados na *A. Lappa* incluem alguns carboidratos, como a inulina, mucilagens, compostos pécicos e açúcares simples (BURLANDO *et al.*, 2010; KARDOSOVA *et al.*, 2003); além de constituintes lipídicos como os ácidos linoléico, linolênico, mirístico e oléico (BURLANDO *et al.*, 2010).

Muitos dos compostos identificados na *A. lappa* já foram isolados e tiveram atividades biológicas descritas, entre os quais as lignanas são a classe de compostos mais estudada. A arctigenina, uma lignana presente na raiz e frutos da planta, diminuiu a produção de TNF- α estimulada por lipopolissacarídeo (LPS) em macrófagos (CHO *et al.*, 1999; ZHAO *et al.*, 2009), possui efeito anti-arrítmico *in vivo* e *in vitro* (ZHAO *et al.*, 2013), assim como neuroprotetor (LI *et al.*, 2014). O efeito antitumoral da arctigenina também já foi descrito por diferentes autores (WANG *et al.*, 2014; HSIEH *et al.*, 2013; SUSANTI *et al.*, 2013, GU *et al.*, 2013). De forma interessante, a arctigenina também é capaz de inibir a replicação do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (EICH *et al.*, 1996; VLIETINCK *et al.*, 1998).

O efeito antitumoral da arctiina, outra lignana isolada da bardana, também já foi descrito (WANG *et al.*, 2005). Além disso, WU e colaboradores (2009) descreveram a atividade antiinflamatória para este composto. Mais recentemente, os efeitos benéficos da arctiina na nefropatia (MA *et al.*, 2013) e na retinopatia (LU *et al.*, 2012) desenvolvida em ratos diabéticos também foram descritos.

PARK e colaboradores (2007) demonstraram que o lappaol F, a diartigenina e a arctigenina, isoladas das folhas de bardana podem inibir a produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos.

O β -sitosterol se destaca entre os compostos presentes na raiz e fruto da bardana por sua atividade hipoglicemiante. MITSUO e colaboradores (2005) demonstraram que esse composto exerce um potente efeito inibitório sobre a atividade de alfa-glicosidases, enzimas envolvidas na glicogenólise, e assim possuem potencial terapêutico no tratamento do diabetes e obesidade. Da mesma forma, a inulina, um carboidrato presente na raiz da bardana, também possui potencial terapêutico para o tratamento do *Diabetes mellitus* por seus efeitos hipoglicemiantes e por melhorar estados de tolerância insulínica (SILVER and KRANTZ, 1931).

No que diz respeito aos ácidos clorogênicos, principalmente isolados das folhas da bardana, já foi descrito uma potente atividade antiviral (CHIANG *et al.*, 2002). Além disso, o efeito terapêutico em complicações associadas ao diabetes através da inibição sobre a formação dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) tem sido descrito para esses composto (GUGLIUCCI *et al.*, 2009).

A toxicidade da bardana não é totalmente conhecida, porém pode potencialmente causar dermatite de contato (CHAN *et al.*, 2011). Entretanto, PREDES e colaboradores (2009), relataram que o tratamento diário com uma infusão das folhas não promove alterações bioquímicas ou morfológicas no tecido hepático de ratos.

No departamento de Farmacologia da UFPR, os estudos com *A. lappa* foram iniciados por SBOLLI (2003), que constatou que o extrato bruto etanólico obtido das raízes da bardana e sua fração clorofórmica promoveram efeitos depressores sobre o sistema nervoso central. Logo a seguir, em 2005 teve início os estudos envolvendo os extratos da bardana e o trato gastrointestinal. Dos SANTOS e colaboradores (2009) demonstraram que o extrato clorofórmico extraído das raízes desta planta apresenta um importante efeito anti-ulcerogênico, o qual foi mediado pela inibição da bomba H^+/K^+ -ATPase. Em 2013, demonstramos que o extrato etanólico obtido das raízes da bardana foi mais efetivo que o extrato clorofórmico na cicatrização das úlceras gástricas (DA SILVA *et al.*, 2013).

Como as folhas ainda são pouco estudadas em relação a outras partes da bardana, neste trabalho optamos por explorar o potencial terapêutico das folhas. Além do mais, como as partes aéreas são descartadas durante a colheita da planta para obtenção da raiz para fins

terapêuticos ou culinários, investigar os efeitos biológicos das folhas contribui para um aproveitamento mais sustentável do cultivo da espécie. Sendo assim, decidimos dar continuidade à avaliação farmacológica da *A. lappa*, investigando o potencial gastroprotetor e cicatrizante gástrico das folhas da planta. Ademais, uma vez que o potencial antidiabético de alguns compostos isolados da bardana têm sido descritos, e dado potencial anti-glicação de estruturas semelhantes às identificadas na composição do extrato e da fração em estudo, o presente estudo também investigou os efeitos das folhas da bardana sobre a cicatrização da mucosa gástrica e sobre a função motora gástrica em ratas diabéticas.

1.1.2 O estômago

1.1.2.1 Aspectos anatômicos do estômago

O estômago é um órgão sacular localizado abaixo do diafragma, entre o esôfago e o duodeno, e pode ser dividido em três porções: fundo, corpo e antro pilórico, sendo limitado na parte superior ou proximal do estômago pelo esfíncter esofágico inferior e na parte inferior ou distal do estômago pelo esfíncter pilórico (Fig.2).

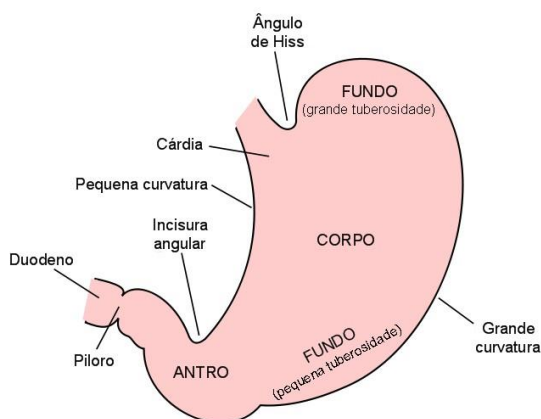


FIGURA 2: Regiões anatômicas do estômago

(FONTE http://ruirodrigues.net/radioterapia/index.php?option=com_content&task=view&id=196&Itemid=77)
Acesso em: 29 abr. 2014).

A superfície da mucosa estomacal é recoberta por diferentes tipos celulares, entre elas células epiteliais colunares, as quais secretam muco e um líquido alcalino que protege o epitélio da lesão mecânica e do ácido gástrico. Funcionalmente, tal mucosa pode ser dividida em região glandular cardíaca, oxíntica e pilórica. A porção glandular cardíaca está localizada logo abaixo do esfíncter esofágico inferior e contém células glandulares secretoras de muco. A porção glandular oxíntica compreende as células parietais secretoras de ácido clorídrico, abrangendo cerca de 80% do estômago (fundo e corpo), células principais (produtoras de pepsinogênio), células produtoras de somatostatina (células D) e células do tipo enterocromafins (ECL) que liberam histamina. A porção glandular pilórica abrange 20% da área total do estômago e apresenta os mesmos tipos celulares das glândulas oxínticas, exceto as células principais, e também possuem as células G, produtoras de gastrina (JAIN *et al.*; 2006).

1.1.2.2 A secreção gástrica

Uma das mais importantes funções do estômago é a produção da secreção ácida gástrica. A regulação da secreção ácida é um processo complexo, envolve mecanismos neurais centrais e periféricos, hormonais, parácrinos e autócrinos os quais convergem para a etapa final da secreção de ácido clorídrico (HCl) (SCHUBERT, 2005).

O controle da secreção ácida gástrica pode ser dividido em três fases: cefálica, gástrica e intestinal (KHANNA e ABRAHAM, 1990). A fase cefálica é considerada como principal contribuinte para a iniciação da secreção, ocorrendo em resposta aos estímulos visuais, olfatórios e gustativos, relacionados à antecipação e ao contato com o alimento (RAMSAY e CARR, 2011). Nesta fase, estímulos oriundos do córtex cerebral, da amígdala e do hipotálamo são transmitidos através do núcleo motor dorsal do nervo vago para o estômago através do nervo vago e são responsáveis por cerca de um quinto da secreção gástrica.

Em adição às influências vagais, a secreção ácida é amplificada na fase gástrica por estímulos mecânicos e físicos que se originam pela presença do alimento no lúmen gástrico (FARRÉ e TACK, 2013). Do ponto de vista quantitativo do controle da secreção, a fase gástrica é a mais importante, visto que grande parte da liberação de ácido durante a digestão ocorre nesta fase (FARRÉ e TACK, 2013). A distensão da parede estomacal decorrente da chegada do alimento ao lúmen gástrico, ativa receptores de estiramento que iniciam reflexos

curtos e longos a fim de intensificar as respostas secretoras, assim a distensão antral causa a liberação de gastrina através das células G, enquanto a distensão do fundo gástrico promove ainda mais o aumento dos níveis de secreção diretamente pela liberação de acetilcolina (Ach) nas proximidades das células parietais e indiretamente pelo aumento da liberação de gastrina e histamina, pelas células G e pelas células similares as enterocromafins (ECL, do inglês: enterochromaffin-like cell), respectivamente, em decorrência da acetilcolina liberada (RAMSAY e CARR, 2011). De forma interessante, nesta fase, ainda que as taxas secretoras de ácido estejam alta, o pH efetivo do lúmen estomacal aumenta e alcança valores próximos a 5 em decorrência do efeito tampão de algumas proteínas, oligopeptídeos e aminoácidos da dieta. Tal fato assegura que a taxa de secreção ácida durante a fase gástrica não seja atenuada por uma diminuição da produção de gastrina, dado que valores menores de pH estimulam células D antrais a liberarem somatostatina, um mediador inibitório da liberação de gastrina pelas células G (CAMILLERI, 2006).

Na fase intestinal o duodeno modera a atividade secretória gástrica através de hormônios e reflexos nervosos em decorrência da chegada do quimo às primeiras porções do intestino delgado (FARRÉ e TACK, 2013). O duodeno inicialmente estimula a secreção gástrica principalmente em decorrência da liberação de gastrina pelas células G duodenais (WALSH, 1990). Logo após, executa uma função inibitória através do envio de sinais do duodeno para o estômago (por meio do sistema nervoso entérico) e para a medula que inibem os núcleos vagais e estimulam os neurônios simpáticos para o envio de sinais inibitórios ao estômago (SCHUBERT, 2005). Além do mais, o quimo também estimula a liberação de secretina e colecistoquinina no duodeno, o que também suprime a secreção gástrica (SCHUBERT, 2005).

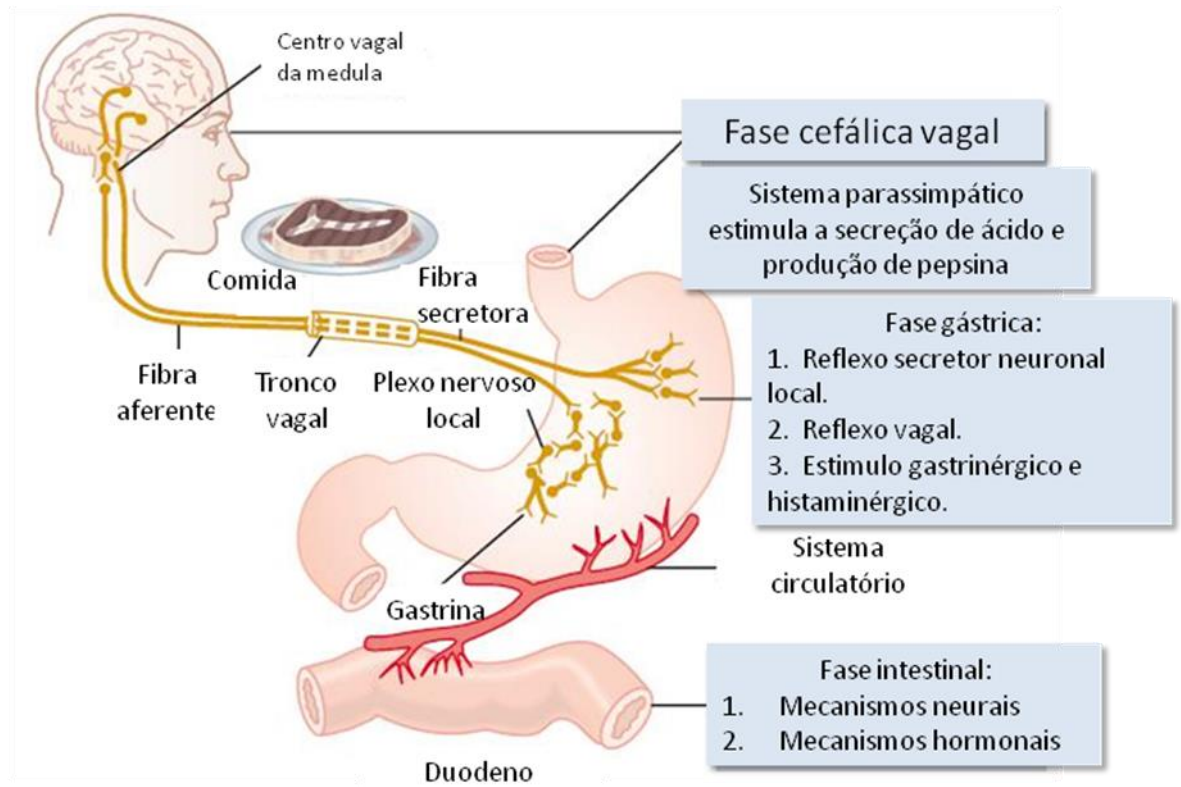


FIGURA 3: Fases do controle da secreção gástrica

(Fonte: http://www.tokresource.org/tok_classes/biobiobio/biomenu/digestion/index.htm> Acesso em: 07 nov. 2014).

Em todas as fases do controle da secreção acima descritas, as células parietais secretam ácido clorídrico em resposta a estímulos neurócrinos, parácrinos e endócrinos mediados pela Ach, histamina e gastrina; através da ativação de receptores muscarínicos do tipo 3 (M3), histaminérgicos do tipo 2 (H2) e de colecistocinina do tipo 2 (CCK2), respectivamente. (SCHUBERT, 2005).

As células parietais possuem uma extensiva rede de canalículos, que em resposta aos estímulos anteriormente descritos, secretam o ácido clorídrico através de um transporte ativo para o lúmen estomacal (FORTE e YAO, 1996). A enzima $H^+/K^+-ATPase$, também conhecida como bomba de prótons, presente nas células parietais, promove o transporte ativo de prótons (H^+) contra um gradiente de concentração de cerca de 4 milhões para 1, o gradiente de íons mais intenso do corpo humano, exercendo papel fundamental na secreção ácida gástrica

(RABON *et al.*, 1983).

A H^+/K^+ -ATPase é formada por duas subunidades, a subunidade α realiza as funções catalíticas e de transporte da enzima (SPICER *et al.*, 2000), enquanto que a subunidade β é extremamente glicosilada e protege a enzima da degradação e é necessária para o deslocamento da enzima entre o citoplasma e a membrana da célula parietal (SCHUBERT, 2005).

A célula parietal (Fig. 3) tem a membrana apical revestindo o lúmen das glândulas gástricas e a membrana basolateral em contato com o fluido intersticial, seus canalículos se estendem desde a membrana apical para dentro da célula (RAMSAY e CARR, 2011). Quando as células parietais são estimuladas, as estruturas túbulo-vesiculares se direcionam à membrana apical e se fusionam a ela, inserindo muitas moléculas de H^+/K^+ -ATPase na membrana (URUSHIDANI *et al.*, 1997). H^+/K^+ -ATPase promove a secreção do H^+ no lúmen gástrico, trocando-o por K^+ , o Cl^- também é expelido através de seus canais ativados por AMPc, o HCO_3^- , formado pela dissociação do H_2CO_3 é expelido por antiporte na membrana basolateral das células parietais que trocam o HCO_3^- principalmente por Cl^- (RAMSAY e CARR, 2011).

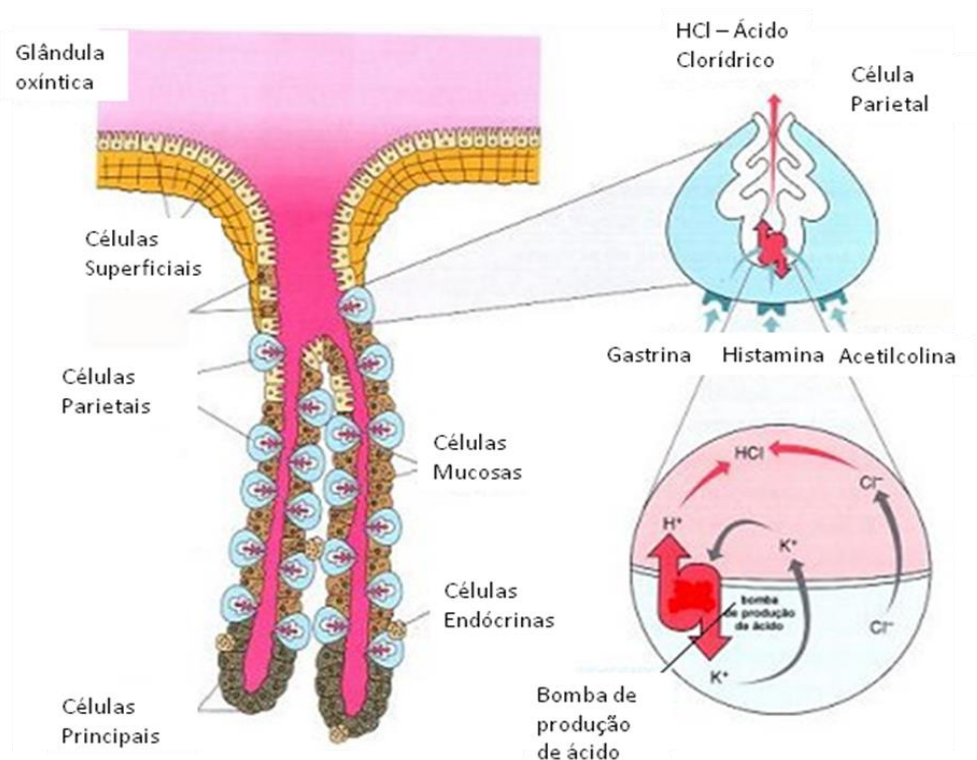


FIGURA 4: A célula parietal

(Fonte: http://www.gotadeluzdosol.com/sau_fisiologia_sistema_digestivo.htm> Acesso em: 02 mai. 2014).

Além dos mecanismos estimulantes da secreção gástrica, outros mecanismos fisiológicos exercem papel inibitório no controle da secreção. Dentre esses mecanismos, a somatostatina é o principal fator inibitório. No antro e fundo do estômago, as células D produtoras de somatostatina estão intimamente ligadas a células alvo para a somatostatina, tais como as células parietais, ECL e células G (SCHUBERT e PEURA, 2008). Assim, um aumento da acidez no lúmen gástrico ativa a liberação de somatostatina para que esta exerça um efeito inibitório sobre a secreção gástrica.

Similarmente a somatostatina, as prostaglandinas (PGs) também inibem a secreção gástrica. As PGs atuam por ação direta nas células parietais ou indiretamente pela inibição da liberação de gastrina (ATAY *et al.*, 2000). As PGs, principalmente a PGE₂, inibe a secreção ácida, pela ativação dos receptores EP₃, via ativação da proteína Gi (HOOGERWERF e PASRICHA 2001; GANOG, 2003).

1.1.2.3 Fatores de agressão e proteção da mucosa gástrica

Mesmo em condições fisiológicas, a mucosa gástrica é freqüentemente exposta a estímulos nocivos que podem causar lesões, tal como a produção endógena do ácido clorídrico e pepsinogênio. Além disso, a ingestão de antiinflamatórios não esteroidais, o stress, o consumo de álcool e a infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* também compõem fatores agressores da mucosa gástrica (QUATRINI *et al.*, 2001; SARGÝN *et al.*, 2003).

A infecção por *H. pylori* e o uso de antiinflamatórios não esteroidais (AINES) são os maiores vilões para a formação da úlcera. A úlcera duodenal é formada em 90% pela infecção de *H. pylori* e 10% pelo uso de AINES. Já a úlcera gástrica é causada em 70% pela *H. pylori* e 30% por AINES (KUSTERS *et al.*, 2006). A presença da *H. pylori* também tem sido associada com a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), podendo gerar estresse oxidativo na mucosa gástrica. As úlceras pépticas causadas pela infecção de *H. pylori* geralmente são tratadas com a combinação de antibióticos e de medicações anti-secretoras (ROBERTSON *et al.*, 2003).

Os AINES são largamente utilizados para o tratamento da dor, febre e inflamação.

Efeitos adversos relacionados ao consumo de AINES incluem o dano da mucosa gastrointestinal, além de agravamento de ulcerações pré-existentes. Esses efeitos deletérios são atribuídos a capacidade desses fármacos em reduzir a produção de PGs, muco e bicarbonato, através da inibição da enzima cicloxigenase (COX), além de uma ação irritante local, ativação de neutrófilos e diminuição da microcirculação. Estes mecanismos podem conduzir a oclusão de micro vasos e subsequente super produção ERO, capazes de induzir a lesão tecidual oxidativa importante na patofisiologia da ulceração na mucosa gástrica induzida por AINES (BRZOZOWSKI 2003 e FORNAI, 2005).

Em contrapartida aos agentes agressores, a mucosa gastrointestinal apresenta fatores de proteção que podem ser divididos, arbitrariamente, uma vez que atuam em conjunto, em: pré-epiteliais, epiteliais e subepiteliais. (FLEMSTRÖM *et al.*, 1999; DONG e KAUNITZ, 2006).

Os principais componentes dos fatores de proteção pré-epiteliais são o muco e o bicarbonato. O muco, constituído de 95% de água e 5% de glicoproteínas denominadas mucinas, é produzido pelas células localizadas no pescoço das glândulas gástricas e células epiteliais (BERNE *et al.*, 2004). A camada de muco funciona como uma barreira física protetora entre o epitélio e o lúmen, protegendo a mucosa contra agentes nocivos, enzimas, microorganismos e pepsina (LAINE *et al.*, 2008). Além disso, tanto a camada de muco como a secreção pré-epitelial de bicarbonato junto à camada de gel aderente, cria um gradiente de pH perto da neutralidade na superfície das células epiteliais (BERNE *et al.*, 2004; LAINE *et al.*, 2008).

A proteção epitelial da mucosa gástrica é conferida pelos aspectos anatômicos e pela constituição bioquímica das células epiteliais gástricas. As junções fechadas e outras barreiras intercelulares controlam a passagem de agentes lesivos do lúmen para a mucosa gástrica, para espaços intersticiais e submucosos. Quando as barreiras gástricas são destruídas e ocorre morte celular, as células necróticas podem ser repostas pela migração de células epiteliais sobreviventes nas bordas da lesão, ou pela divisão de células do colo glandular as quais migram ate o lúmen e diferenciam-se em células epiteliais superficiais (LAINE *et al.*, 2008).

A proteção epitelial também envolve fatores bioquímicos, como o sistema antioxidante composto por moléculas enzimáticas e não enzimáticas que promovem a primeira linha de defesa contra ERO, incluindo o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxil (OH^{\cdot}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As EROs interagem indiscriminadamente com macromoléculas essenciais, como o DNA, proteínas e lipídeos (CNUBBEN *et al.*, 2001).

As defesas enzimáticas compõem a primeira linha de defesa antioxidante da mucosa gástrica e incluem a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione S-transferase (GST) (BAYIR, 2005). A segunda linha de defesa antioxidante é realizada por alguns compostos de moléculas pequenas, incluindo vitaminas, flavonóides da dieta, carotenóides, ácido úrico e a glutathione reduzida (GSH) (CNUBBEN *et al.*, 2001).

A proteção subepitelial do estômago envolve a microcirculação, pois o fluxo sanguíneo protege a mucosa por assegurar a chegada de uma quantidade ótima de oxigênio, nutrientes, bicarbonato, além de remover substâncias tóxicas (WALLACE, 2001). As células endoteliais dos microvasos geram potentes vasodilatadores como o óxido nítrico (NO), PGs e prostaciclina (PGI), os quais protegem a mucosa gástrica contra fatores agressores e se opõem à ação danosa de vários agentes vasoconstritores como os leucotrienos C₄, tromboxano A₂ e endotelina (WALLACE, 2001; LAINE *et al.*, 2008).

Quase todos os mecanismos de defesa são estimulados e/ou facilitados pelas PGs, que é dependente dos níveis de expressão da isoforma do tipo 1 da enzima cicloxigenase (COX-1). Além de aumentar o fluxo sanguíneo, as PGs promovem a inibição da secreção ácida, estimulam a secreção de muco, bicarbonato e fosfolipídios e contribuem para a aceleração da restituição epitelial e cicatrização da mucosa gástrica (LAINE *et al.*, 2008).

Quando os níveis superficiais da defesa da mucosa falham ou há uma lesão luminal, o próximo nível de defesa é a resposta inflamatória aguda. Os neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas pelo sistema imune e possuem um papel crucial no desenvolvimento da resposta inflamatória, uma vez que migram da circulação para o local da lesão, a fim de facilitar o reparo e reduzir a entrada de microrganismos na circulação sistêmica (WALLACE, 2001). A ativação de receptores acoplados a proteína G causa um aumento de cálcio citosólico que age como segundo mensageiro e induz uma série de eventos, resultando na resposta celular dos neutrófilos, a qual inclui a liberação de espécies reativas de oxigênio e a exocitose das enzimas proteolíticas (POECKEL *et al.*, 2008).

1.1.3 ÚLCERA PÉPTICA

Úlcera é uma lesão profunda da mucosa, onde componentes do tecido epitelial e conectivo, incluindo miofibroblastos subepiteliais, células do músculo liso, vasos e nervos, podem estar destruídos (MILANI E CALABRO, 2001). O termo “ulcera péptica” compreende tanto as úlceras gástricas (estomacais) como as duodenais. Em geral, as úlceras ocorrem mais comumente no duodeno, onde 90% estão localizadas a 3 cm da junção do piloro com a mucosa duodenal. No estômago as úlceras se localizam mais comumente no antro (60%) e na junção do antro com o corpo na pequena curvatura (25%). A úlcera péptica é um dos distúrbios mais comuns que afetam o sistema gastrointestinal. A incidência de úlcera péptica durante a vida é superior a 10%, com um pico que ocorre entre 65 e 74 anos, sendo ligeiramente maior nos homens do que em mulheres (OFMAM, 2000; ABITOL, 2005). É inquestionável que as doenças como as úlceras pépticas diminuem a qualidade da vida das pessoas, resultando em custos diretos e indiretos (OFMAM, 2000).

A fisiopatologia das úlceras pépticas é considerada um processo multifatorial, que pode ser atribuído ao desequilíbrio entre fatores agressivos e as defesas locais da mucosa. Embora o tratamento seja frequentemente conduzido para a redução dos fatores agressivos, pode também ser dirigido para o fortalecimento das defesas da mucosa do estômago e duodeno (VENKATARANGANNA *et al.*, 1998; JAIN *et al.*, 2007). Vale ainda ressaltar que a úlcera péptica é considerada uma doença crônica, e na maioria dos casos, a recorrência anual é esperada (BRUNTON *et al.*, 2006). A taxa de recorrência de úlcera pode estar relacionada com a qualidade da cicatrização da úlcera (ARAKAWA *et al.*, 2012).

Morfologicamente, a úlcera péptica é constituída de uma margem formada pela mucosa adjacente não necrosada (composta de tecido epitelial) e a base da úlcera (composta de tecido de granulação). Este último consiste de fibroblastos, macrófagos e células endoteliais formando microvasos (TARNAWSKI, 2000). A cicatrização das úlceras pépticas é um processo ativo e complexo que inclui a reconstrução da mucosa pela formação de tecido de granulação na base da úlcera, formação de novos vasos através da angiogênese e o re-estabelecimento da arquitetura glandular (KONTUREK *et al.*, 2005).

Durante o processo cicatricial, a proliferação epitelial e endotelial é largamente conduzida pelos fatores de crescimento. No caso da angiogênese, o fator de crescimento

endotelial vascular (VEGF) aparece entre os mais importantes e é liberado pelas próprias células endoteliais e pelas plaquetas (WALLACE, 2005).

O processo inicial de cicatrização das úlceras é acompanhada pelo aumento do fluxo sanguíneo na área ulcerada, dos níveis plasmáticos de gastrina e de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 1 beta (IL-1 β), as quais tem seus níveis reduzidos ao longo da cicatrização. A hipergastrinemia observada no período inicial da cicatrização pode ser atribuída à extraordinária supressão ácida gástrica e expressão de fatores de crescimento como o fator de crescimento endotelial (EGF), fator transformador de crescimento alfa (TGF- α) e o fator de crescimento do hepatócito (HGF), os quais controlam a proliferação celular e são bem conhecidos por exibirem atividade antissecretora (BRZOZOWSKI, 2003).

Por mais de um século, as úlceras pépticas foram controladas cirurgicamente, com altas taxas de morbidade e mortalidade. O tratamento farmacológico resumia-se em neutralizar a acidez gástrica estomacal com a utilização de antiácidos, como bicarbonato de sódio (NaH₂CO₃), carbonato de cálcio (CaCO₃), hidróxido de alumínio [Al(OH)₃] e hidróxido de magnésio [Mg(OH)₂] ou associações. Porém, por alterar o pH gástrico e urinário, os antiácidos tem a capacidade de interagir com uma variedade de fármacos através de interações farmacocinéticas que alteram a absorção, biodisponibilidade e eliminação renal. Além disso, os efeitos associados ao uso de anti-ácidos incluem constipação ou diarreia, e hoje em dia são utilizados principalmente para o alívio rápido dos sintomas da úlcera péptica (YUAN *et al.*, 2006; BRUNTON *et al.*, 2006).

Antagonistas muscarínicos como a pirenzepina inibem a secreção ácida bem como a motilidade gástrica, mas o uso clínico destas drogas diminuiu em decorrência da disponibilidade de medicamentos anti-secretores mais eficazes e com menos efeitos colaterais (JAIN *et al.*, 2007).

O desenvolvimento das drogas ao longo dos anos indicou a mudança gradual no foco de tratamento, através do desenvolvimento de antagonistas de receptores H₂ como Cimetidina (1976) e Ranitidina (1982). Os antagonistas de receptores H₂ são eficientes na supressão ácida e foram usados por mais de 25 anos, até o aparecimento dos inibidores da bomba de prótons como Omeprazol (1988), seguido por Lansoprazol (1995), Rabeprazol (1999) e Esomeprazol (2001) (JAIN *et al.*, 2007).

Os inibidores da bomba de prótons são pró-fármacos, necessitando ativação em ambiente ácido. Entram na célula parietal a partir do sangue e, devido a sua fraca natureza básica, acumulam-se em canalículos secretores ácidos da célula parietal, onde são ativados por um processo catalisado por prótons que resulta na formação de uma sulfenamida tiofílica ou ácido sulfênico. Esta forma ativada reage por meio de ligação covalente com o grupo sulfidril de cisteínas do domínio extracelular da H^+/K^+ -ATPase, resultando em uma inativação irreversível da bomba. A secreção do ácido só se reinicia após a síntese e inserção de novas moléculas de H^+/K^+ -ATPase na membrana luminal (YUAN *et al.*, 2006; BRUNTON *et al.*, 2006).

A recorrência das lesões gástricas pode frequentemente ocorrer mesmo durante a manutenção da terapia com fármacos anti-secretores, apesar de essas drogas serem efetivas no tratamento das úlceras pépticas (ARAKAWA *et al.*, 2012). Além disso, o tratamento em longo prazo com agentes anti-secretores pode causar graves efeitos adversos, incluindo fraturas osteoporóticas e não-osteoporóticas, hipomagnesemia, hipergastrinemia, hiperplasia das células ECL e o em casos mais graves, favorecer o desenvolvimento de neoplasia gástrica (MOULI e AHUJA, 2011). Além do mais, a supressão ácida extrema, mesmo que em doses recomendadas, pode resultar em acloridria e desencadear infecções entéricas e pneumonias, além de diminuir a absorção da vitamina B12 e de cálcio (JAIN *et al.*, 2007). Em virtude desses inúmeros inconvenientes apresentados pelos tratamentos anti-ulcerosos, a investigação de novas drogas para o tratamento de doenças ácido-pépticas tem sido contínua e importante.

1.1.4 Motilidade gástrica

De modo geral, é possível distinguir quatro principais funções motoras do estômago, que são a acomodação do conteúdo ingerido, a mistura do bolo alimentar com os sucos digestivos, a redução do tamanho das partículas ingeridas e o esvaziamento gástrico (WOOD, 2008).

As regiões anatomicamente distintas do estômago (fundo, corpo, antro e piloro) não se correlacionam com as regiões funcionais do órgão que, conforme indicado na figura 5, pode ser dividido em estômago proximal (fundo e um terço do corpo) e estômago distal (dois terços do corpo e antro) (WOOD, 2008).

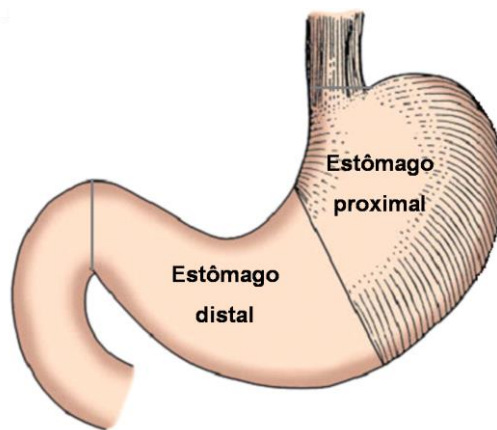


FIGURA 5: Divisão funcional do estômago.

O estômago proximal serve como um reservatório temporário para o bolo alimentar e desempenha papel fundamental em sua acomodação, enquanto o estômago distal mistura os alimentos com os sucos digestivos. Quando o alimento sólido já tiver sido processado no estômago distal e alcançado o tamanho e consistência adequados, o piloro regula a sua saída para o duodeno (ROSTAS *et al.*, 2011).

A atividade da musculatura gástrica é modulada por influências miogênicas, neurais e hormonais. Contrações miogênicas espontâneas são fundamentais para a motilidade gástrica, ocorrendo mesmo na ausência de qualquer outra influência e com a participação das células intersticiais de Cajal (ICC) na propagação do estímulo elétrico pelas células musculares lisas (ROSTAS *et al.*, 2011). A regulação neuronal pode ser originada primariamente no plexo mioentérico gástrico, o qual também contribui para a estimulação extrínseca parassimpática (vagal) e simpática (TACK, 2007). Além disso, diferentes hormônios também exercem significativo papel na regulação da motilidade gástrica de forma estimulatória (gastrina, grelina e motilina) ou inibitória [colecistocinina, glucagon, peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1), peptídeo YY, secretina e somatostatina] (ROSTAS *et al.*, 2011). O controle rigoroso da motilidade gástrica garante um adequado esvaziamento gástrico, em taxa e composição adequada, permitindo assim uma ótima absorção intestinal.

1.1.4.1 Esvaziamento gástrico normal e alterado

A regulação do esvaziamento gástrico inicia com a acomodação do bolo alimentar no estômago proximal, que em resposta aos estímulos oriundos da distensão muscular permite o fluxo do conteúdo gástrico para o estômago distal. Desta forma, qualquer redução no tamanho do estômago proximal resulta em aumento da pressão intra-gástrica e acelera o esvaziamento gástrico (ROSTAS *et al.*, 2011). A composição e a temperatura do conteúdo luminal também afetam o esvaziamento gástrico, os líquidos são enviados ao duodeno mais rapidamente que os sólidos e a diminuição da temperatura do conteúdo luminal retarda o esvaziamento gástrico (MISHIMA *et al.*, 2009). A taxa de esvaziamento gástrico também é controlada pelo conteúdo calórico do bolo alimentar, por tal motivo as gorduras possuem esvaziamento mais lento em relação às proteínas e carboidratos. Similarmente, conteúdos hipertônicos ou hipotônicos também são esvaziados mais lentamente do que soluções isotônicas. Outros fatores que determinam a taxa de esvaziamento gástrico incluem ansiedade, medo, depressão e exercício intenso (ROSTAS *et al.*, 2011).

Desordens na motilidade gástrica ocorrem quando há alterações nos processos de esvaziamento gástrico, ou da função de reservatório do estômago proximal, ou ainda da motilidade interdigestiva (responsável pela eliminação de partículas indigeríveis) (TACK, 2007). Os mecanismos complexos de controle da atividade motora gástrica são vulneráveis a um grande número de patologias, como por exemplo, o *Diabetes Mellitus* (FOGLE, 2013) e a doença de Parkinson (MARRINAN *et al.*, 2014). Os distúrbios da motilidade gástrica apresentam um espectro de disfunção variando do esvaziamento gástrico retardado, como na dispepsia funcional e na gastroparesia; ao esvaziamento gástrico anormalmente rápido, como na síndrome de *dumping* (TACK, 2008).

A dispepsia funcional é caracterizada por sintomas de plenitude pós-prandial, saciedade precoce, dor epigástrica na ausência de uma causa orgânica identificável (TACK *et al.*, 2006). A gastroparesia constitui uma desordem severa de esvaziamento gástrico retardado mesmo na ausência de obstrução mecânica, e pode ser desencadeada por uma variedade de causas gastrintestinais e sistêmicas (ABELL *et al.*, 2006). No entanto, uma vez que o esvaziamento gástrico retardado também é encontrado em até 30 % dos pacientes com dispepsia funcional (TACK *et al.*, 2004), a distinção entre a dispepsia funcional e a gastroparesia de causa idiopática ainda não está claramente definida. A síndrome de *dumping* ocorre principalmente

após vagotomia ou gastrectomia parcial ou total, e é caracterizada por esvaziamento gástrico rápido acompanhado por sintomas como cefaléia, taquicardia, tremor, sudorese, náuseas e diarreia e a minimização dos sintomas é realizada por modificações dietéticas (TACK, 2008).

Em relação às desordens de motilidade gástrica retardada, as abordagens terapêuticas incluem intervenção farmacológica ou intervenção cirúrgica em casos mais severos ou refratários à terapia medicamentosa. Os fármacos pro cinéticos têm sido considerados drogas de escolha nos distúrbios caracterizados por esvaziamento gástrico retardado, por estimular, direta e indiretamente, a contração da musculatura lisa do trato gastrointestinal (KARAMANOLIS E TACK, 2006). Esses fármacos compõem uma classe heterogênea de compostos que atuam em diferentes tipos de receptores, e incluem antagonistas dos receptores dopaminérgicos do tipo 2 (D2), como a metoclopramida e a domperidona; agonistas dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT 4, como a cisaprida, e o tegaserode; e agonistas dos receptores da motilina como a eritromicina. Entretanto, por conta da pobre resposta sintomática em determinadas condições clínicas e a presença de vários efeitos colaterais, fica clara a necessidade do desenvolvimento de novos agentes pro cinéticos. Assim, dado o envolvimento da acomodação gástrica prejudicada e a hipersensibilidade visceral em muitas desordens da motilidade gástrica, fármacos que melhorem a responsividade fúndica ou analgésicos viscerais são abordagens atraentes para o desenvolvimento de drogas para o tratamento dessas doenças.

1.1.5 Diabetes

O termo *Diabetes mellitus* (DM) compreende um grupo de doenças metabólicas de várias etiologias, caracterizado por hiperglicemia crônica, com distúrbios no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas (DIAS *et al.*, 2004). A principal causa desta desordem é a deficiência, absoluta ou relativa, da insulina, um hormônio secretado pelas células β pancreáticas, imprescindível na regulação dos níveis glicêmicos (ADA, 2014). A hiperglicemia crônica que ocorre no DM está associada à disfunção, ao dano e a falha de vários órgãos, especialmente olhos, rins, sistema nervoso, coração e vasos sanguíneos (ADA, 2010). Clinicamente é caracterizada pela tríade sintomatológica composta por poliúria, polidipsia e polifagia (PONTES *et al.*, 2004). Usualmente, o diabetes é diagnosticado através de critérios

de valores da glicemia, tanto em jejum como após duas horas da administração oral de 75 g de glicose (teste de tolerância à glicose oral) (ADA, 2014). Além disso, os níveis de hemoglobina glicada também são uma terceira opção para o diagnóstico do diabetes (IEC, 2009). Em resumo, além da sintomatologia clínica, outros critérios diagnósticos adotados, são a glicemia plasmática a qualquer momento do dia superior ou igual a 200 mg/dL, ou superior ou igual a 126 mg/dL em jejum de 8 h, ou ainda níveis glicêmicos superior ou igual a 200 mg/dL durante o teste de tolerância à glicose oral de 2 h (ADA, 2014).

A classificação etiológica do DM abrange três tipos: tipo 1 (DMT1), tipo 2 (DMT2) e outros tipos específicos de DM relacionados a estados ou síndromes específicas, incluindo o DM gestacional (RODRIGUES e MOTTA, 2012).

Independentemente do tipo, segundo a OMS a prevalência mundial do diabetes é de 8,3% e estima-se que 382 milhões de pessoas entre 20 e 79 anos seja portador de DM (IDF, 2013). Dados da Federação Internacional de Diabetes (IDF) projetam um que o número de diabéticos no mundo em 2035 será de 592 milhões, um aumento de 55% em relação a 2013. No Brasil, de acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2014), um pouco mais de 12 milhões de pessoas, ou ainda 6,2 % da população brasileira sofre com a doença. Além disso, estima-se que 10% dos casos de diabetes no Brasil sejam de DM do tipo 1 e os 90% restantes do tipo 2 (IDB, 2010).

No DMT1, os pacientes são dependentes do uso terapêutico de insulina exógena para impedir a marcante tendência à cetoacidose, sendo muito comum que os pacientes progridam para insulinopenia grave em períodos curtos de tempo (ROSSETI *et al.*, 2003). Na maioria dos casos, o início da doença ocorre na infância ou adolescência e o diagnóstico geralmente baseia-se no início abrupto de um quadro clínico com níveis glicêmicos acentuadamente aumentados (PALMER *et al.*, 2004). É caracterizada clinicamente por poliúria, polidipsia, perda de peso, apesar da polifagia, hiperglicemia, glicosúria, cetoacidose e, em casos mais graves, o coma (DIAS *et al.*, 2004).

O DMT2 é comumente encontrado na idade adulta, sua ocorrência aumenta progressivamente com o envelhecimento, acometendo com maior frequência indivíduos com sobrepeso ou obesidade e com histórico familiar da doença (SBD, 2003). Diferentemente dos portadores de DMT1, os pacientes de DMT2 eventualmente fazem uso da insulina para controle glicêmico, mas não é caracterizada dependência desta substância e nem tendência a cetoacidose, o tratamento corrente deste tipo de diabetes visa manter o controle glicêmico

adequado, seja com dieta hipocalórica, aumento da prática de exercícios físicos ou uso de medicações que podem ser utilizadas isoladamente ou em associações (SALTIER, 2001). Entre os fármacos disponíveis para o controle glicêmico estão incluídos os sensibilizadores da ação de insulina (metformina, tiazolidinedionas), os anti-hiperglicemiantes (acarbose) e os secretagogos (sulfoniluréias, repaglinida, nateglinida) (ARAÚJO *et al.*, 2000).

Independentemente do tipo de DM, a prevenção das complicações associadas à doença é uma das maiores preocupações dos profissionais de saúde devido à sua gravidade e repercussões para a qualidade de vida do paciente. Essas complicações podem ser classificadas em agudas e crônicas, destacando-se a cetoacidose diabética e o coma hiperosmolar não-cetótico entre as complicações agudas (PEDROSA *et al.*, 2006); e as lesões macrovasculares, microvasculares e neuropáticas entre as complicações crônicas (ADLER *et al.*, 2000; TRICHES *et al.*, 2009).

1.1.5.1 Sintomas gastrointestinais associados ao *Diabetes mellitus*

Já é conhecido que 76% dos pacientes com diabetes apresentam um ou mais sintomas gastrointestinais (KOCH, 1999; BYTZER *et al.*, 2001) e embora esses sintomas não sejam considerados causas importantes de mortalidade, eles impactam negativamente na saúde geral e na qualidade de vida desses pacientes (CAMILLERI *et al.*, 2010). Assim, pacientes diabéticos podem desenvolver uma variedade de sintomas gastrointestinais, incluindo dispepsia funcional, dor epigástrica ou abdominal, náuseas e vômitos, azia, diarreia, distúrbios de motilidade como constipação e gastroparesia, além de apresentarem maior susceptibilidade à ulceração da mucosa gástrica com prejuízo no processo cicatricial dessas lesões (HARSCH *et al.*, 2003; HARSCH *et al.*, 2009; KONTUREK *et al.*, 2010; BARAKA *et al.*, 2010; TAKAGI *et al.*, 2012). A maioria desses sintomas é resultante de anormalidades na motilidade gastrointestinal que, por sua vez, podem ser uma manifestação da neuropatia autonômica secundária à hiperglicemia crônica, condição invariavelmente ligada ao DM (KIM *et al.*, 2011). No entanto, crescentes evidências indicam que a gênese dos sintomas gastrointestinais em pacientes diabéticos é multifatorial (QUAN *et al.*, 2008), ou seja, a neuropatia autonômica não pode ser considerada a única razão para as desordens do TGI associadas à DM.

a. Diabetes e úlcera gástrica

Pouca atenção tem sido dada para a incidência e taxa de cura das úlceras gástricas em diabéticos, uma vez que essas lesões são consideradas, por alguns autores, de pouca ocorrência nesses indivíduos (BRZOZOWSKA *et al.*, 2004). Contudo, estudos recentes indicam que as úlceras gástricas que ocorrem no decurso do diabetes são de maior gravidade e, muitas vezes associadas à complicações como hemorragia gastrointestinal (PIETZSCH *et al.*, 2002; BOEHME *et al.*, 2007).

O DM promove efeitos deletérios nos mecanismos de defesa da mucosa gástrica, aumentando a susceptibilidade da mucosa às lesões gástricas. De fato, diversos estudos pré-clínicos demonstraram que a indução experimental de DM em ratos é capaz de aumentar a vulnerabilidade da mucosa gástrica aos efeitos de diferentes agentes ulcerogênicos, tais como a isquemia e reperfusão, o estresse, a administração de AINEs e a instilação de ácido acético diretamente na mucosa gástrica. (TASHIMA *et al.*, 2000; HARSCH *et al.*, 2003; BRZOZOWSKA *et al.*, 2004; NAITO *et al.*, 2009; KONTUREK *et al.*, 2010). Mecanismos bioquímicos têm sido propostos para explicar as alterações teciduais envolvidas no prejuízo promovido pelo diabetes nos fatores protetores da mucosa gástrica. Uma das hipóteses correntes é de que a capacidade antioxidante endógena estaria diminuída nos diabéticos, conseqüentemente contribuindo para o estresse oxidativo na mucosa gástrica (SANTINI *et al.*, 1997; REIS *et al.*, 2008). No DM, a etiologia do estresse oxidativo envolve uma variedade de mecanismos, entre eles a excessiva produção de ERO através da auto-oxidação da glicose plasmática, a diminuição das concentrações de antioxidantes como o GSH e vitamina E, a diminuição da expressão e da atividade de enzimas antioxidantes como a SOD e a CAT, o aumento da atividade da enzima aldose redutase e a formação dos produtos finais da glicação avançada [AGEs (do inglês, *Advanced GlycationEnd-products*)] (KOCH, 1999; NAITO *et al.*, 2009).

Em adição ao estresse oxidativo, outros mecanismos estão envolvidos na vulnerabilidade da mucosa gástrica à ação de agentes ulcerogênicos na presença do diabetes experimental, tais como a diminuição do fluxo sanguíneo gástrico através da diminuição na produção de fatores angiogênicos, como o fator de crescimento de fibroblastos, assim como a diminuição na secreção de muco e bicarbonato na mucosa gástrica e a disfunção nos neurônios

aferentes sensíveis a capsaicina envolvidos na proteção dessa mucosa (TAKEHARA *et al.*, 1996; KOROLKIEWICZ *et al.*, 2000).

Além da vulnerabilidade da mucosa gástrica, diferentes estudos têm demonstrado o efeito deletério do DM na cicatrização das úlceras gástricas. HARSCH e colaboradores (2003) demonstraram que o diabetes experimental prejudica dramaticamente a cicatrização das úlceras gástricas através do aumento na liberação de citocinas pró-inflamatórias, da atenuação da angiogênese e da diminuição dos níveis locais de proteínas promotoras da cicatrização gástrica como a proteína do choque térmico 70 (HSP-70). BRZOZOWSKA e colaboradores (2004) também demonstraram que ratos diabéticos exibem um prejuízo na cicatrização de úlceras gástricas crônicas associado à diminuição do fluxo sanguíneo gástrico na margem da úlcera, além de uma regulação negativa na expressão de fatores de crescimento como o VEGF e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1).

Como descrito anteriormente, o foco de tratamento das úlceras gástricas em indivíduos normoglicêmicos ou em diabéticos, é a supressão da secreção ácida gástrica. Entretanto, estudos pré-clínicos (BASTAKI *et al.*, 2010; CHANG *et al.*, 2004; TASHIMA *et al.*, 2000) e clínicos (FELDMAN e SCHILLER, 1983; HASLER *et al.*, 2008) apontam a diminuição na secreção ácida gástrica na presença de DM. Estas evidências sugerem que a secreção ácida gástrica não seja o principal fator responsável pelo efeito deletério do DM na mucosa gástrica. Desta forma, uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nas peculiaridades da vulnerabilidade da mucosa gástrica e no prejuízo da cicatrização das úlceras gástricas na presença de diabetes é essencial para o desenvolvimento de terapias específicas para lesões gástricas que ocorrem no decurso do diabetes.

b. Diabetes e a motilidade gástrica

Desordens que afetam a motilidade gástrica são as mais frequentes entre as complicações gastrointestinais associados à DM. A gastroparesia que ocorre no decurso do diabetes se destaca entre essas desordens e é denominada gastroparesia diabética. A gastroparesia acomete até 58% dos portadores de DMT1 (JUNG *et al.*, 2010; VINIK e ZIEGLER, 2007) e em até 30% dos pacientes com DMT2 (CHOUNG *et al.*, 2012). Uma vez

estabelecida, a gastroparesia diabética tende a persistir mesmo havendo um controle glicêmico eficaz (CAMILLERI *et al.*, 2011), porém quanto maior os níveis glicêmicos, maior é o retardo no esvaziamento gástrico. Nesse sentido, BARNETT e OWYANG (1988) demonstraram que as contrações gástricas são quase ausentes em níveis glicêmicos superiores a 250 mg/dL e marcadamente reduzidas em níveis glicêmicos entre 140 e 175 mg/dL em pacientes diabéticos. Entretanto, é interessante ressaltar que se por um lado a hiperglicemia agrava a gastroparesia diabética (KOCH e UWAIFO, 2008), por outro lado, essa condição também pode dificultar o controle da glicemia através de alterações na farmacocinética de hipoglicemiantes administrados oralmente, uma vez que o retardo no esvaziamento gástrico resulta em níveis plasmáticos erráticos da medicação, influenciando na secreção de insulina pós-prandial e alterando a absorção de carboidratos (FRASER *et al.*, 1990; SCHVARCZ *et al.*, 1997).

Muitas teorias têm sido sugeridas sobre os eventos etiológicos envolvidos no desenvolvimento da gastroparesia em pacientes diabéticos. O fator etiopatogênico mais comumente implicado na gastroparesia diabética é a neuropatia autonômica (CESARINI *et al.*, 1997). Na gastroparesia diabética essa neuropatia está associada à desmilenização do nervo vago (GUY *et al.*, 1984; CAMILLERI *et al.*, 2011) e à anormalidades em axônios e dendritos em gânglios simpáticos pré-vertebrais (DUCHEN *et al.*, 1980; CAMILLERI *et al.*, 2011), sugerindo que os componentes parassimpático e simpático do sistema autônomo sejam afetados. Outras evidências sugerem alterações na liberação de hormônios entéricos envolvidos na regulação da função digestiva na gênese da gastroparesia diabética, os quais também parecem estar relacionados com uma diminuição da atividade vagal (CESARINI *et al.*, 1997; KHOO *et al.*, 2010). Entre as alterações hormonais podemos citar a hipergastrinemia, o que contribui ainda mais para o retardo do esvaziamento gástrico em diabéticos e é causada tanto pelo tônus vagal diminuído, como pelo pH gástrico aumentado devido à deficiência de secreção ácida que ocorre na gastroparesia (BORG *et al.*, 2009). Além da gastrina, os níveis de colecistocinina também se encontram elevados em pacientes com gastroparesia (BORG *et al.*, 2009; KHOO *et al.*, 2010). De forma interessante, em pacientes com gastroparesia diabética, os níveis de motilina estão em quantidades normais ou elevadas. Diante disso, especula-se que mesmo em níveis normais ou elevados a ação da motilina é dificultada pela deficiência colinérgica instalada pela neuropatia, visto que a motilina facilita o esvaziamento gástrico através da liberação local de acetilcolina (KHOO *et al.*, 2010).

Além da neuropatia autonômica e das alterações nos níveis e atividade dos hormônios entéricos, a redução na expressão da enzima óxido nítrico sintase neural (nNOS ou NOS 1) e a

perda de células intersticiais de Cajal (ICC) já foram reportadas como comuns na gastroparesia (GANGULA *et al.*, 2007; CAMILLERI *et al.*, 2011). A diminuição de nNOS nos neurônios entéricos parece não estar ligada à morte desses neurônios, e sim a uma diminuição na expressão enzimática (CAMILLERI *et al.*, 2011). Entretanto em animais diabéticos não-obesos ou camundongos NOD (do inglês: non-obese diabetic), a diminuição da expressão da NOS1 ocorre logo após o desenvolvimento do diabetes e independe do desenvolvimento de gastroparesia (CHOI *et al.*, 2008). Portanto, é possível que modificações pós-traducionais na enzima possam ser mais importantes no desenvolvimento da gastroparesia diabética do que os níveis absolutos em que é expressa (GANGULA *et al.*, 2007). De fato, GANGULA e colaboradores (2010), utilizando ratas diabetizadas pela administração de estreptozotocina, demonstraram que a diminuição na síntese de óxido nítrico e conseqüente redução no relaxamento da musculatura lisa gástrica pode ser explicada pelo desacoplamento da NOS1, que em sua forma ativa apresenta-se dimerizada, ademais esses autores também descreveram que uma suplementação com tetrahidrobiopterina (BH₄), um cofator essencial para a NOS1, restabelece o esvaziamento gástrico em níveis normais. Entretanto, os mecanismos envolvidos na alteração da regulação nitrérgica durante a gastroparesia diabética, principalmente no sexo feminino, ainda carecem de mais estudos.

Alem do prejuízo na sinalização nitrérgica, a perda de ICC é a anormalidade neuropatológica mais comumente observada tanto na gastroparesia diabética como na idiopática (ORDÖG *et al.*, 2008). Essas células possuem múltiplas funções no trato gastrointestinal e estão envolvidas em aspectos da neurotransmissão e da mecanotransdução da musculatura lisa gastrointestinal (FARRUGIA, 2008).

Em conjunto, as disfunções no controle da motilidade gástrica promoveriam um prejuízo no relaxamento do fundo gástrico induzido pela refeição e na distribuição intragástrica do bolo alimentar, além de prejuízo nas contrações fásicas antrais ou no tônus pilórico culminando no aumento da resistência ao fluxo de saída no píloro e intestino delgado (PARKMAN *et al.*, 2011). Processos autoimunes, principalmente em pacientes com DMT1, também podem estar associados à patogênese da gastroparesia, assim JACKSON e colaboradores (2010) descreveram que nesses pacientes as respostas contráteis da musculatura lisa gástrica podem estar prejudicadas em decorrência da presença de anticorpos circulantes aos canais de cálcio do tipo L. Além disso, a observação de que a mutação A3243G no DNA mitocondrial em portadores de DMT2 predispõe à incidência de gastroparesia, sugere que

fatores genéticos podem contribuir para o desenvolvimento da doença (NOHARA *et al.*, 2006).

Atualmente, uma série de opções para o tratamento da gastroparesia está disponível. Além de modificações na dieta, a utilização de procinéticos como metoclopramina, domperidona ou eritromicina, ou ainda o uso de antieméticos são indicados no tratamento desta desordem. Como alguns pacientes ainda são refratários à farmacoterapia vigente, abordagens endoscópicas e cirúrgicas são indicadas (CAMILLERI *et al.*, 2011). Dado o significativo impacto da gastroparesia na qualidade de vida dos pacientes diabéticos tanto nos aspectos físicos, emocionais e sociais (HASLER *et al.*, 2010), um melhor entendimento dos eventos patológicos e uma melhor otimização no tratamento desta condição tornam-se necessários.

1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial terapêutico das folhas de *A. lappa*, através da avaliação do efeito gastroprotetor do extrato solúvel em etanol (SE) das folhas do vegetal, da fração ativa desse extrato e do composto majoritário nessa fração. Bem como avaliar o efeito cicatrizante gástrico da fração ativa sobre úlceras gástricas em ratas normais e diabéticas, além de investigar os efeitos sobre a gastroparesia em ratas diabéticas. Por fim, esse estudo também almejou a compreensão de mecanismos envolvidos em todos esses efeitos.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o efeito gastroprotetor em ratas do extrato solúvel em etanol (SE) obtido das folhas de *A. lappa* e da fração ativa SE-AE tanto pela via oral como intraperitoneal;
2. Identificar um composto gastroprotetor na fração ativa SE-AE;
3. Investigar os mecanismos envolvidos no efeito gastroprotetor da fração ativa;
4. Avaliar o efeito cicatrizante gástrico da fração ativa e os mecanismos envolvidos nesse efeito;
5. Avaliar o potencial antioxidante e anti-glicação protéica *in vitro* da fração ativa;
6. Avaliar o efeito cicatrizante gástrico da fração ativa sob condições hiperglicêmicas e os mecanismos envolvidos nesse efeito;
7. Avaliar o efeito da fração de interesse sobre as alterações da motilidade gástrica em ratas diabéticas;
8. Avaliar os mecanismos envolvidos no efeito da fração de interesse sobre a função motora gástrica de ratas diabéticas;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BOTÂNICO

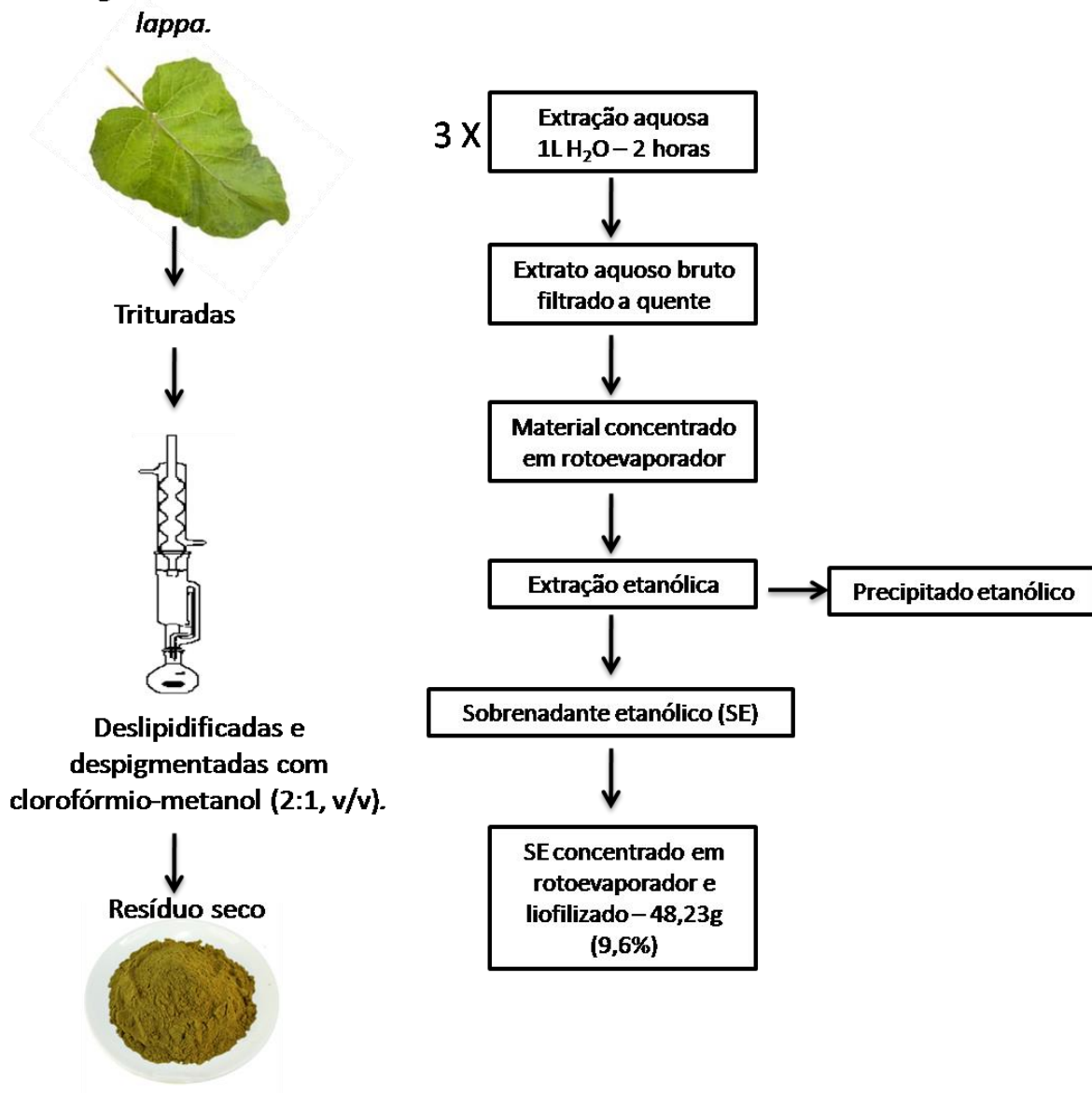
Folhas de *Arctium lappa* L. foram gentilmente fornecidas pela Chamel Indústria e Comércio de Produtos Naturais Ltda (Campo Largo, Paraná, Brasil), em um único lote (8857). As folhas foram coletadas em setembro de 2010, cortadas, secas em estufa, embaladas em sacos plásticos e enviadas ao Departamento de Farmacologia e então ao Prof. Dr. Thales Ricardo Cipriani e Dr. Lauro de Souza (Departamento de Bioquímica - UFPR). Uma exsicata foi depositada no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná, Brasil, sob o número 37173.

3.1.1 Preparação do extrato e frações

A preparação dos extratos e frações foram realizadas através da colaboração do Dr. Lauro Mera de Souza, do departamento de Bioquímica da UFPR e foi realizada como descrito por CARLOTTO (2013). Assim, 500 g de folhas foram trituradas, deslipidificadas e despigmentadas com clorofórmio-metanol (2:1, v/v) em extrator soxhlet. O resíduo seco da extração com clorofórmio-metanol foi submetido à extração aquosa (1 L de água destilada), sob refluxo, por 2 horas. Este processo foi repetido três vezes. Após cada etapa, o extrato aquoso bruto foi filtrado a quente. O material resultante das três extrações foi reunido, concentrado em rotaevaporador até pequeno volume, tratado com três volumes de etanol e filtrado a vácuo (utilizando-se papel de filtro qualitativo), a fim de separar precipitado e sobrenadante. O sobrenadante etanólico da extração aquosa foi concentrado por rotaevaporação e liofilizado, obtendo um rendimento de 48,23 g (9,6%), o qual foi denominado de extrato solúvel em etanol (SE) (figura 6A). O fracionamento do SE por partição líquido/líquido foi realizado com 32,5 g do SE solubilizado em 100 mL de água destilada. Esta solução foi particionada, de maneira seqüencial, com 50 mL de clorofórmio (sete vezes), acetato de etila (onze vezes), e butanol (seis vezes). Como demonstrado na figura 6B, o processo de partição rendeu cinco frações: solúvel em clorofórmio (SE-C), rendimento

de 0,34%; solúvel em acetato de etila (SE-AE), com rendimento de 4%; solúvel em butanol (SE-B), com rendimento de 7,99%; emulsionada durante o fracionamento com acetato de etila, ou seja, formada como uma terceira fase durante a purificação com este solvente (SE-EAE), com rendimento de 7,56%; e aquosa, a fração residual após as extrações com todos os solventes utilizados (SE-A), com rendimento de 44,3%.

A 500g de folhas de *A. lappa*.



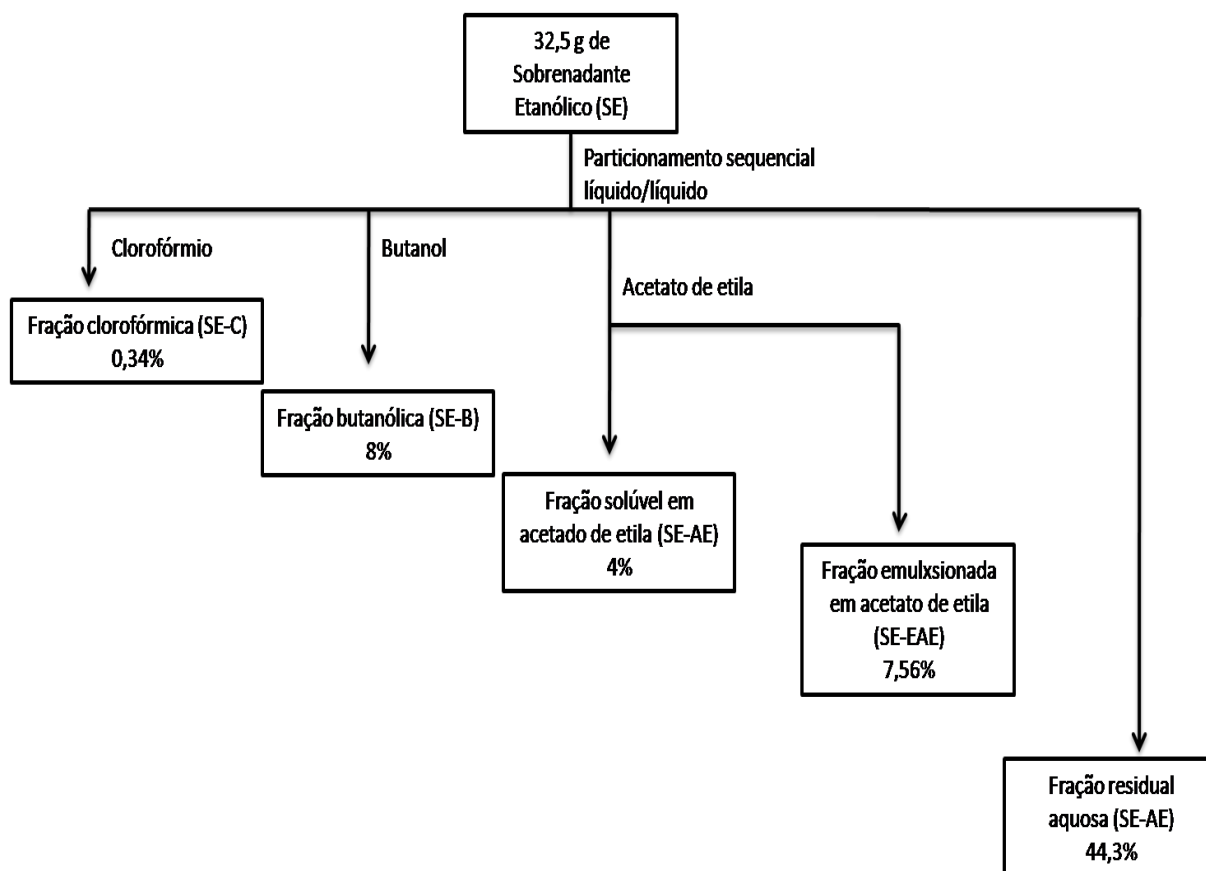
B

FIGURA 6: Fluxograma de obtenção do sobrenadante etanólico (SE-Painel A) e da obtenção das diferentes frações (Painel B).

3.2 IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA

Toda a identificação química foi realizada através da colaboração do Dr. Lauro Mera de Souza, do departamento de Bioquímica da UFPR e foi realizada como descrito por CARLOTTO (2013). Assim resumidamente, foi realizada a separação analítica por cromatografia líquida com o objetivo de identificar e quantificar os compostos presentes no SE e na fração SE-AE. Para isso foi utilizado um sistema Acquity-UPLCTM (Waters, MA, EUA), composto por bomba binária, amostrador automático e um forno de coluna. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente (22 °C) e o forno da coluna a 60 °C. Uma

coluna Waters BEH-C18, com 50 mm x comprimento de 2,1 milímetros e 1,7 μm de tamanho de partícula foi utilizada.

A fase móvel foi composta de solução aquosa de ácido fórmico 0,1% (v/v) (eluente A) e metanol (eluente B), um gradiente linear foi desenvolvido com o aumento do solvente B, de 0 a 38% em 10 min, retornando à condição inicial em 11 min, com fluxo de 0,5 ml/min. As amostras (2 mg/ml) foram preparadas em H_2O -MeOH (7:3, v / v) e o volume injetado foi de 5 μL . A detecção foi realizada por um detector de arranjo de diodos (PDA, 200-400 nm) e, as análises *on-line*, por espectrometria de massas com ionização “electrospray” (ESI-MS) por espectrômetro LTQ-Orbitrap-XL (Thermo-Científico), operando na ionização negativa e positiva, em à pressão atmosférica (API), com N_2 com gás de dessolvatação a 60 unidades arbitrárias (ua) no *seath gas* e 20 ua no gás auxiliar. As energias foram fixadas em 3,5 kV na fonte, -20 V no capilar e -281 V no *tube lens*. As amostras foram analisadas numa corrente iônica total de modo (TIC – *total ion current*) (m/z 100-1000).

Foram utilizados como padrões de referência: ácido clorogênico, rutina, ácido cafeico, ácido *p*-coumárico e cinarina adiquiros comercialmente (Sigma-Aldrich) e uma amostra conhecida de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) (DARTORA, 2011, SOUZA *et al.*, 2011).

Posteriormente, com o objetivo de separar e coletar os compostos presentes na fração SE-AE para posterior análise por ressonância magnética nuclear (NMR), uma cromatografia em escala semi-preparativa foi realizada utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) modelo LC 1220 Infinity, equipado com um detector de UV de canal único e coletor automático de fração (Agilent Technologies, CA, EUA). A coluna utilizada foi uma C18, com diâmetro interno de 50 mm x 7,8 mm e 5 μm de tamanho de partícula (Waters, MA, EUA), a fase móvel foi composta de solução aquosa de ácido fórmico 0,1% (v/v) (eluente A) e metanol (eluente B). Um gradiente linear, com fluxo de 1 ml/min, foi de 0 a 50% do solvente B em 30 min. O comprimento de onda utilizado para detecção dos ácidos dicafeoilquínicos presentes na fração foi de 325 nm.

As análises de ressonância magnética nuclear foram realizadas em um Avance III Bruker (600 MHz) utilizando sonda inversa de 5 mm de diâmetro. A análise foi desenvolvida a 30 °C utilizando metanol- D_4 como solvente e referência interna para deslocamentos químicos ($\delta^{13}\text{C} = 49.15$ and $^1\text{H} = 3.31$, calibrado em relação ao tetrametilsilano $\delta^{13}\text{C}/^1\text{H} = 0$).

Juntamente com os experimentos em 1D (^1H , ^{13}C), experimentos em 2D COSY, HSQC e HMBC também foram conduzidos.

3.3 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DOS ÁCIDOS DICAFOILQUÍNICO – ACETONAÇÃO

As frações HE-B e HE-AE (2 mg) foram dissolvidos em 1 ml de acetona seca e ácido *p*-toluenossulfônico liofilizado (2 mg). A solução foi agitada (3 h) e, em seguida, a reação foi interrompida pela adição de uma solução aquosa de NaOH à neutralidade. Estas soluções foram centrifugadas e o solúvel removido e evaporado até à secura sob uma corrente de N_2 . As amostras foram dissolvidas em H_2O -MeOH (7:3, v / v) e analisada por UHPLC-MS como descrito acima.

3.4 DILUIÇÃO DO EXTRATO E FRAÇÕES.

O extrato, as frações e os compostos foram diluídos com água destilada com a adição de Tween 80[®] 0,5%, a frio, antes de cada experimento.

3.5 DROGAS E SAIS

Para a execução dos protocolos experimentais foram utilizados: acetato de sódio, ácido ascórbico, ácido clorídrico, ácido etanosulfônico 4-2-hidroxietilpiiperazina-1 (HEPES), ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido tricloroacético, balsamo do Canadá, carbonato de sódio, carboximetilcelulose, cloreto de magnésio, cloreto de sódio, cloreto de potássio, etanol, eosina, fenolftaleína, fostato de sódio monobásico, hematoxilina, L-tirosina, molibdato de amônio, nitrato de sódio, nitrito de sódio, sulfato ferroso, Triton X-100, Tween 20, vermelho

de fenol, xilol (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). Ácido acético, etanol, formaldeído, peróxido de hidrogênio, metanol (Neon reagentes, São Pulo, Brasil), BHT, Frutose, glicose, reativo de Folin sacarose, xilenol laranja (Synth, São Paulo, Brasil). Insulina (Lilly, Indianópolis, EUA). Domperidona (Janssen, São José dos Campos, Brasil). Dimetilformamida, citrato de sódio, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), formaldeído e parafina (Merck Biosciences, Darmstadt, Alemanha). Acetilcolina, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido *p*-coumarico, ácido periódico, albumina de soro bovino (BSA), alcian blue, alfa-naftil-etilenodiamina, anticorpo anti-tubulina (T-3526), atropina, cinarina (ácido 1,5-dicafeoilquínico), diclorofluoresceína (DCFH), dicloro-nitro-benzeno (CDNB), estreptozotocina, glutatona redutase, guanetidina, glutatona reduzida (GSH), hexadeciltrimetilamônio (HTAB), indometacina, nitroblue-tetrazolium (NBT), N-etilmaleimida (NEM), N- ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), nitroprussiato de sódio, omeprazol, ouabaína, pirogalol, prostaglandina E₂ (PGE₂), reativo de Schiff, rutina, serotonina, sulfanilamida tetrametilbenzidina (TMB), TRIS-HCl, 5,5'-ditiobis 2-ácido nitrobenzóico (DTNB), β – fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido β -NADPH (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA). Cetamina e xilazina (Syntec, Cotia, Brasil). Reagente de Bradford (Bio Rad, Hercules, CA, USA) Anticorpo policlonal anti-nNOS (sc-5302), anticorpo secundário conjugado (SC-2060) a peroxidase secundário (Santa Cruz Biotechnology[®], EUA). Aminoguanidina (Cayman Chemical Company, Michigan, EUA).

3.6 ANIMAIS

Foram utilizadas ratas (*Ratus norvegicus*, variedade Wistar) adultas, com peso variando entre 200 a 250 g, fornecidas pelo Biotério da Universidade Federal do Paraná e mantidas sob condições controladas de temperatura e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas), com acesso livre à água e ração. Foi utilizado o estômago de um coelho (*Oryctolagus cuniculus*) albino, com peso variando entre 1 a 2 kg, oriundo do Biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR).

Os protocolos experimentais que utilizaram animais estão de acordo com as normas internacionais e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPR, com o número de protocolo 500 e 674.

3.7 TESTE DE ATIVIDADES GERAIS E TOXICIDADE AGUDA

O teste de atividades gerais foi realizado de acordo com o descrito por LITCHFIELD e WILCOXON (1949) com o objeto de detectar sinais de qualquer possível efeito farmacológico e/ou tóxico produzido pelo SE em animais conscientes. Adicionalmente, neste experimento também determinamos o valor da dose letal 50% (DL₅₀) para o SE. Assim, camundongos fêmeas, mantidos em jejum de 12 h com acesso livre a água, foram separados randomicamente em grupos de 6 animais e receberam uma única administração oral ou intraperitoneal de doses crescentes do SE (0,005; 0,05; 0,5 e 5 g/kg). Após o tratamento, cada animal foi colocado sobre uma superfície plana e observado continuamente durante a primeira hora e então sucessivamente a cada hora durante as primeiras seis horas e, posteriormente, duas vezes ao dia, durante sete dias, para a verificação da ocorrência de possíveis sinais indicativos de algum efeito farmacológico e/ou tóxico (tremores, convulsões, hipoatividade, ataxia, letargia, e outros). Os animais do grupo controle receberam veículo (água + Tween 80 0,5% - 0,1 mL/100 g, v.o.) ou solução salina (NaCl 0,9%, 0,1 mL/100g, i.p). Ao fim do período de observação, a dose requerida para provocar a morte em 50% dos animais testados (DL₅₀) para cada via de administração foi determinada e expressa em g/kg de peso corpóreo.

3.8 ÚLCERA GÁSTRICA AGUDA INDUZIDA POR ETANOL 98%

As lesões gástricas induzidas por etanol foram realizadas segundo metodologia descrita por ROBERT e colaboradores (1979). As ratas foram mantidas em jejum de 18 h com acesso livre a água, separados em diferentes grupos, tratados oralmente com veículo (água + Tween 80 0,5% - 0,1 mL/100 g, v.o.), omeprazol (40 mg/kg) ou diferentes doses do SE (1-100 mg/kg). Sessenta minutos após o tratamento foi administrado etanol 98% [0,5 mL/200 g, via oral (v.o.)], um agente necrotizante para indução da lesão gástrica. A eficácia das diferentes frações do SE também foi avaliada através da lesão induzida por etanol, nesta ocasião as doses de cada fração foram calculadas com base na DE₅₀ do SE nesse modelo experimental e do rendimento de obtenção de cada fração. Assim, os animais foram

oralmente tratados com veículo (água + Tween 80 0,5% - 0.1 mL/100 g), omeprazol (40 mg/kg) ou as frações SE-C (0,01 mg/kg), SE-AE (0,15 mg/kg), SE-B (0,30 mg/kg), SE-EAE (0,29 mg/kg), SE-A (1,68 mg/kg) e como descrito anteriormente, após 60 min receberam etanol 98% (0,5 mL/200 g, v.o.).

Em virtude dos resultados obtidos nos experimentos descritos anteriormente, em outros grupo de experimentos, os animais foram pré-tratados com veículo (água + Tween 80 0,5% - 0,1 mL/100 g, v.o), omeprazol (40 mg/kg, v.o), SE [0,1-1 mg/kg, intraperitoneamente (i.p)], fração SE-AE (0,15 e 0,015 mg/kg, i.p), ácido 1,5-*O*-dicafeoilquínico (Sigma-Aldrich, 5,7 µg/kg, v.o) ou ácido 1,3-*O*-dicafeoilquínico isolado da fração SE-AE (5,7 µg/kg, v.o). Sessenta minutos após os pré-tratamentos orais e trinta minutos após os pré-tratamentos intraperitoneais os animais receberam etanol (0,5 mL/200 g, v.o.), como descrito anteriormente.

Em todos os experimentos, os animais foram eutanaziados 60 min após a administração do etanol 98%, sendo que os estômagos foram removidos, abertos pela curvatura menor, estendidos e fotografados para a análise das lesões gástricas. A avaliação dessas lesões foi realizada através do programa ImageTool® Versão 3.0, no qual foi possível mensurar a área total lesionada de cada estômago em mm². Os resultados foram expressos em mm² de área lesionada.

3.9 ÚLCERA GÁSTRICA AGUDA INDUZIDA POR ETANOL 98% EM RATAS PREVIAMENTE TRATADAS COM N-ETILMALEIMIDA (NEM) OU INDOMETACINA.

Em virtude dos resultados obtidos nos experimentos descritos anteriormente e a quantidade de composto isolado disponível, os protocolos apresentados a partir desse ponto foram realizados apenas para avaliar os efeitos da fração SE-AE.

As lesões gástricas induzidas por etanol em ratas previamente tratadas com NEM foram realizadas segundo metodologia descrita por LUIZ-FERREIRA e colaboradores (2010), enquanto que as lesões gástricas induzidas por etanol em ratas previamente tratadas com indometacina foram realizadas segundo metodologia descrita por DIAS e colaboradores

(2001). Ratas mantidas em jejum de 18 horas com acesso livre a água foram separados em 3 grupos e tratados intraperitonealmente com NEM (10 mg/kg), indometacina (10 mg/kg) ou solução salina (0,1 mL/100g). Após 30 min, cada um dos quatro grupos anteriores foi dividido em dois subgrupos (n=6), os animais de cada subgrupo receberam oralmente veículo (água + Tween 80 0,5% - 0,1 mL/100 g) ou a fração SE-AE (0,15 mg/kg). Decorridos 30 min, todos os grupos experimentais receberam etanol 98% (0,5 mL/200 g, v.o.) para indução da lesão gástrica. A seguir, os animais foram eutanaziados 60 min após a administração do etanol 98%, sendo que os estômagos foram removidos, abertos pela curvatura menor, estendidos e fotografados para a análise das lesões gástricas como descrito anteriormente no item 3.7.

3.10 ÚLCERA GÁSTRICA AGUDA INDUZIDA POR INDOMETACINA

As lesões gástricas induzidas por indometacina foram realizadas segundo metodologia descrita por MORIMOTO e colaboradores (1991) com poucas modificações. As ratas, mantidas em jejum de 12 h com acesso livre a água, separados em diferentes grupos, foram oralmente pré-tratadas com veículo (água + Tween 80 0,5% - 0,1 mL/100 g), omeprazol (40 mg/kg), prostaglandina E2 (PGE₂, 20µg/kg) ou a fração SE-AE (0,15 e 1,5 mg/kg). Para a indução da úlcera gástrica, decorridos sessenta minutos dos pré-tratamentos, foi administrado o AINE indometacina (80 mg/kg, 2 mL/200 g, v.o.). Seis horas após a administração do AINE, os animais foram eutanaziados, os estômagos removidos, abertos pela curvatura menor, estendidos e fotografados para a análise das lesões gástricas como descrito anteriormente no item 3.7.

3.11 QUANTIFICAÇÃO DE MUCO ADERIDO NA MUCOSA GÁSTRICA

Amostras teciduais das regiões do corpo gástrico de animais dos diferentes grupos experimentais submetidos à indução das lesões gástricas agudas por etanol ou indometacina foram pesadas e incubadas em 5 mL de solução de Alcian Blue 0,1% preparada em uma solução de sacarose 160 µM e acetato de sódio 50 mM (pH 5), onde permaneceu corando por

2 h em temperatura ambiente. O excesso de Alcian Blue foi removido através de duas lavagens sucessivas com sacarose 250 mM, a primeira por 15 min e a segunda durante 45 min. Depois, o conteúdo de corante no tecido complexado com o muco gástrico foi extraído com solução de cloreto de magnésio 500 mM durante 2 h. O material extraído foi então misturado com igual volume de éter dietílico e centrifugado a 3600 rpm por 10 min. A absorbância foi determinada em comprimento de onda de 598 nm. O conteúdo de muco foi calculado usando uma curva padrão de Alcian Blue (6,25-100 µg) e os resultados foram expressos em µg Alcian Blue/g tecido (CORNE *et al.*, 1974).

3.12 ÚLCERA GÁSTRICA CRÔNICA INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO 80%

As lesões gástricas induzidas por ácido acético seguiram a metodologia originalmente proposta por OKABE e colaboradores (1971), com poucas modificações. As ratas, mantidos em jejum de 18 horas com acesso livre a água, pesadas, separadas em diferentes grupos de 8 animais, foram anestesiadas com xilazina e cetamina (10 mg/kg e 5 mg/kg, i.p., respectivamente), tendo a parede abdominal aberta e o estômago exposto. Para a indução de úlceras, um cilindro de vidro de 6 mm de diâmetro foi aplicado sobre a serosa do estômago, no qual foi injetado 500 µL de ácido acético 80%. Após 1 min, o ácido foi aspirado e substituído por solução salina para limpeza do local. Em seguida a salina foi aspirada, o local foi seco com o auxílio de uma haste com algodão. Então, o cilindro foi retirado da superfície do estômago e a parede abdominal foi suturada. Após a recuperação da anestesia, os animais retornaram ao biotério e permaneceram em regime de restrição alimentar com consumo livre de água até o dia seguinte, quando então iniciou-se o período de tratamento. O tratamento consistiu na administração por via oral de veículo (água + Tween 80 0,5% - 0,1 mL/100 g), omeprazol (20 mg/kg) ou diferentes doses de SE-AE (0,1; 1 e 10 mg/kg v.o). O tratamento foi iniciado no segundo dia após a cirurgia, realizado 30 min após a retirada da ração e teve duração de sete dias. Ao final do período de tratamento, os animais foram eutanaziados, o estômago removido e esticado para posterior análise. A avaliação das lesões gástricas foi feita pela medida do comprimento x altura (mm²) da úlcera, utilizando uma régua graduada.

3.13 ÚLCERA GÁSTRICA CRÔNICA INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO 80% EM RATAS DIABÉTICAS

De acordo com método previamente descrito por HARSCH e colaboradores (2003), a indução do *Diabetes mellitus* foi realizada por uma única injeção intraperitoneal de estreptozotocina (STZ), 50 mg/kg, diluída em tampão citrato 0,01 M, pH 4,5, em ratas previamente submetidas a um jejum sólido por 18 horas. Animais do grupo veículo receberam apenas o tampão citrato 0,01 M, pH 4,5- 0,1 mL/kg, i.p. Os níveis de glicose sanguínea em jejum foram mensurados três dias após a injeção de STZ, em amostras sanguíneas coletadas da veia caudal de cada animal, utilizando um glicosímetro Accu-chek Active (Roche, New Jersey, NY, USA). Animais que apresentaram valores de glicemia acima de 250 mg/dL foram considerados diabéticos, como descrito por DE MORAES (2014).

Transcorridos 28 dias, ratas com valores de glicemia superior a 250 mg/dL foram submetidas a um jejum sólido por 18 horas. A indução das úlceras crônicas gástricas foi realizada da mesma forma que descrito na seção anterior (item 4.12). Após a indução das lesões gástricas, da sutura da parede abdominal e recuperação anestésica, os animais retornaram ao biotério e permaneceram em regime de restrição alimentar com consumo livre de água até o dia seguinte. A partir do segundo dia após a indução da úlcera, os animais foram divididos em diferentes grupos experimentais, tratados duas vezes ao dia, durante sete dias com veículo (água + Tween 80 0,5% - 0,1 ml/100 g, v.o.), insulina (6 U/dia s.c.), omeprazol (40 mg/kg, v.o.), ácido ascórbico (40 mg/kg, v.o) ou a fração SE-AE (1,0 e 10 mg/kg, v.o). Apenas o tratamento com insulina foi iniciado a partir do terceiro dia de indução do diabetes. Ao término dos tratamentos, a glicemia em jejum foi novamente mensurada como descrito anteriormente e amostras sanguíneas foram coletadas da veia caudal de cada animal para mensuração dos níveis de hemoglobina glicada, o qual foi realizado utilizando um kit comercial (Glycohemoglobin HbA₁ Test SP, In vitro, Iatbira, MG, BR). Após estes procedimentos, os animais foram eutanaziados, os estômagos removidos pela curvatura menor e as áreas das lesões quantificadas como descrito anteriormente no item 3.12.

3.14 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA

3.14.1 Avaliação histopatológica

O método para avaliação microscópica foi realizado de acordo com KALLAYA e colaboradores (2006) com poucas modificações. A porção ulcerada de amostras provenientes de estômagos previamente submetidos à lesão gástrica induzida por ácido acético foram fixadas durante 24 h em ALFAC (etanol 85%, formol 10% e ácido acético (5%). Logo após as amostras foram desidratadas, embebidas em parafina, cortadas em finas seções de 7 µm.

Para avaliação de mudanças histopatológicas e da extensão das lesões gástricas, uma parte das lâminas com os cortes histológicos obtidos foram submetidas à coloração de hematoxilina e eosina (HE), desidratadas em uma série ascendente de álcoois, diafanizadas em xilol e montadas entre lâmina e lamínula. As análises de mudanças histopatológicas e da extensão das úlceras foram observadas e fotografadas em scanner de lâminas (Meta Viewer Version 2.0.100, MetaSystems, North Royalton, OH, USA).

3.14.2 Avaliação histoquímica do conteúdo de mucinas

A análise histoquímica para mucina foi realizada de acordo com MOWRY e WINKLER (1956), a fim de verificar as alterações no conteúdo de mucinas da mucosa gástrica após a indução das úlceras pelos diferentes modelos experimentais e os efeitos dos diferentes tratamentos nestas alterações. Desta forma, os cortes histológicos obtidos como descrito anteriormente foram oxidados em ácido periódico 0,5% por 5 min, lavados em água destilada, corados com reativo de Schiff por 20 min e lavados em água sulfurosa e em água corrente. Finalmente, as lâminas foram contracoradas com hematoxilina por 20 s, desidratadas em uma série ascendente de álcoois, diafanizadas em xilol e montadas entre lâmina e lamínula. As lâminas foram observadas em microscópio óptico trinocular (Olympus BX 40, Olympus Optical do Brasil, São Paulo, SP, BR) e fotografadas em câmera de captura (Olympus DP 71, Olympus Optical do Brasil, São Paulo, SP, BR) e as glicoproteínas

(mucinas) coradas pelo ácido periódico de Schiff (PAS) foram quantificados com o programa ImageJ[®] de acordo com descrito por PEREIRA e colaboradores (2012).

3.15 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE (MPO)

A MPO é uma enzima encontrada primariamente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e comumente usada como um marcador do conteúdo tecidual de leucócitos polimorfonucleares como os neutrófilos que migram para o local do estímulo inflamatório. O método baseia-se na liberação de MPO para o tecido lesado e foi realizado de acordo com descrito por BRADLEY e colaboradores (1982).

Amostras compostas da porção ulcerada, incluindo base e margem da úlcera, da mucosa gástrica de ratas normoglicêmicas e diabéticas submetidas às lesões gástricas induzidas por ácido acético foram pesadas e homogeneizadas com tampão fosfato de potássio (200 mM) pH 6,5. O homogenato obtido foi centrifugado a 10000 rpm durante 20 min e, posteriormente, o precipitado obtido foi ressuspensionado com 1 mL de tampão fosfato de potássio 80 mM na presença de 0,5% de hexadeciltrimetilamônio (HTAB). Após homogeneização, as amostras foram novamente centrifugadas (12000 rpm, 20 min a 4 °C) em microcentrífuga de alta velocidade refrigerada (5415 R – Eppendorf do Brasil, São Paulo, SP, BR) e triplicatas de alíquotas de 30 µL do sobrenadante de cada amostra, ou água destilada (branco), foram acrescidas de 220 µL de uma solução reacional (100 µL de tampão fosfato 80 mM, 85 µL de tampão fosfato 22 mM e 15 µL de H₂O₂ 0,017%) em placas de 96 poços. A reação foi iniciada com a adição de 20 µL de tetrametilbenzidina (TMB), um substrato enzimático que resulta num produto colorido, em cada poço. As amostras foram então incubadas por 3 min a 37 °C, e a reação foi interrompida pela adição de 30 µL de acetato de sódio 1,46 M (pH = 3,0) em cada poço. A atividade enzimática foi determinada em espectrofotômetro a 620 nm. Os resultados foram expressos como unidade de densidade óptica (D.O)/mg de proteína/ 3 minutos.

3.16 QUANTIFICAÇÃO *IN VITRO* DOS NÍVEIS DE ATIVIDADE DA MPO

Para verificar se o SE ou a fração SE-AE possuem efeito inibitório direto, *in vitro*, sobre a atividade da MPO, decidiu-se realizar outro experimento, no qual o extrato e a fração foram incubados diretamente em amostras de tecido não lesado e tecido ulcerado. Para esse experimento, as amostras teciduais foram preparadas conforme o protocolo descrito anteriormente (seção 3.15). As amostras teciduais ulceradas representam amostras de úlceras obtidas dos animais tratados somente com veículo e, portanto, com esperado nível de leucócitos polimorfonucleares. Para a realização do teste foi utilizada placa de 96 poços, onde foram adicionadas triplicatas de 30 µL do sobrenadante de cada amostra por poço, ou água destilada (branco) e em seguida o extrato ou a fração foram incubados por 15 min a temperatura ambiente em diferentes concentrações (0,1; 1; 10 e 100 µg/mL). Após esse período de incubação, foram adicionados H₂O₂ e TMB. A atividade enzimática foi determinada em espectrofotômetro a 620 nm e os resultados expressos como D.O./mg de proteína/ 3 minutos.

3.17 AVALIAÇÃO DE INDICADORES NÃO ENZIMÁTICOS DO ESTRESSE OXIDATIVO

Para as análises dos parâmetros não enzimáticos do estresse oxidativo, amostras coletadas das lesões gástricas foram homogeneizadas em tampão fosfato 200 mM (pH 6,5) a 4°C. O homogenato obtido foi utilizado para determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) e espécies reativas de oxigênio (EROs).

3.17.1 Quantificação dos níveis de glutathiona reduzida(GSH)

Os níveis de GSH na mucosa gástrica de ratas submetidas às lesões gástricas induzidas por etanol, indometacina ou ácido acético foram determinados pelo método de SEDLAK e LINDSAY (1968). Em 50 μ L de homogenato foram adicionados 40 μ L de ácido tricloroacético (ATC) 12,5% e os tubos foram agitados em um agitador de tubos AP 56 (Phoenix, Araraquara, SP, BR) e centrifugados por 15 min a 3.000 rpm em microcentrífuga de alta velocidade refrigerada (5415 R – Eppendorf do Brasil, São Paulo, SP, BR). Posteriormente, triplicatas de alíquotas de 10 μ L do sobrenadante, ou água destilada (branco), foram adicionadas a 290 μ L de tampão TRIS 0,4 M (pH 8,9) em placa de 96 poços. A reação foi iniciada com a adição de 5 μ L de DTNB (5,5'-ditiobis 2-ácido nitrobenzóico) 1 mM, 5 min antes da leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 415 nm. Os procedimentos foram realizados a 4 °C e os valores individuais interpolados em uma curva padrão de GSH (0,375–3 μ g), com os valores expressos em μ g de GSH/g de tecido.

3.17.2 Quantificação intracelular das espécies reativas de oxigênio (EROs)

A determinação de espécies reativas de oxigênio presentes na mucosa gástrica de ratas normoglicêmicas e diabéticas submetidas às lesões gástricas induzidas por ácido acético foi realizada de acordo com KESTON e BRANDT (1965) com modificações de DONG e colaboradores (2008). O ensaio consistiu na oxidação da sonda fluorescente DCFH (diclorofluoresceína) por espécies reativas de oxigênio, a fluorescência emitida foi medida em um espectrofluorímetro. Para a realização deste método, 200 μ L do homogenato, ou água destilada (branco), foi incubado com 30 μ L de DCFH-DA (10 μ M) por 40 min ao abrigo da luz. Após o período de incubação, triplicatas de alíquotas de 300 μ L do homogenato foram transferidas para placa de 96 poços e a fluorescência foi mensurada em espectrofluorímetro. Todas as medidas foram feitas utilizando comprimento de onda com excitação de 488 nm e emissão de 520 nm.

3.18 AVALIAÇÃO DE INDICADORES ENZIMÁTICOS DO ESTRESSE OXIDATIVO

Para as análises dos parâmetros enzimáticos do estresse oxidativo, amostras coletadas da porção ulcerada (incluindo margem e base da úlcera) de estômagos de ratas diabéticas submetidas à indução de úlcera por ácido acético foram homogeneizadas em tampão fosfato 200 mM (pH 6,5) a 4°C. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 8900 rpm durante 20 min a 4 °C em microcentrífuga de alta velocidade refrigerada (5415 R – Eppendorf do Brasil, São Paulo, SP, BR). O sobrenadante obtido foi coletado e utilizado para determinação do nível protéico e atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) e glutathione peroxidase (GPx).

3.18.1 Dosagem de proteínas

As concentrações de proteína foram determinadas pelo método de Bradford utilizando albumina de soro bovino como padrão (1,0 – 0,0625 mg/kg) e realizada de acordo com as instruções do fabricante.

3.18.2 Quantificação dos níveis da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada de acordo com o método de MARKLUND e MARKLUND (1974) e baseia-se na capacidade da SOD em inibir a auto-oxidação do pirogallol. As reações foram realizadas em tampão Tris HCl 200 mM com EDTA 2 mM em pH 8,5 a temperatura ambiente. Em tubos de polipropileno, triplicatas de 20 µL de aliquota do sobrenadante foram misturadas com 442,5 µL de tampão Tris – EDTA. Após agitação em agitador de tubos AP 56 (Phoenix, Araraquara, SP, BR), 25 µL de pirogallol 1 mM foram adicionados e a solução foi incubada por 20 min. A reação foi interrompida com 12,5 µL de HCl 1N. Os tubos de polipropileno foram centrifugados a 4000 rpm durante 4 min a 4 °C em microcentrífuga de alta velocidade refrigerada (5415 R – Eppendorf do Brasil, São Paulo, SP,

BR). e 300 μ L do sobrenadante obtido foi pipetado em microplaca para leitura em espectrofotômetro a 205 nm. Os resultados foram comparados com o controle (Tampão Tris-EDTA com pirogalol sem incubação + média sem amostra e sem incubação), sendo este valor igual a 100%. A quantidade de proteína que inibiu a reação em 50% (IC₅₀) equivale a 1 unidade (U) de SOD. Os resultados foram expressos em U de SOD/mg de proteína.

3.18.3 Quantificação dos níveis da atividade da enzima catalase (CAT)

A determinação da atividade da CAT presente na mucosa gástrica foi realizada com base no método de AEBI (1984). Para realização deste ensaio, triplicatas de 5 μ L do sobrenadante de cada amostra, ou de água destilada (branco), foi pipetado em microplaca de 96 poços e acrescido de 195 μ L de uma solução reacional (tampão Tris/ EDTA 5mM, pH 8,0, peróxido de hidrogênio 30% e água destilada) e imediatamente lidas em espectrofotômetro sob absorvância de 240 nm. Os resultados foram expressos em μ mol/mg de proteína/min.

3.18.4 Quantificação dos níveis da atividade da enzima glutathiona-S-transferase (GST)

A determinação da atividade da GST foi realizada com base no método de HABIG e colaboradores (1974). A atividade específica da GST foi determinada pela conjugação do dicloro-nitro-benzeno (CDNB) com GSH, formando um tioéter que pode ser monitorado pelo aumento de absorvância. Assim, triplicatas de 100 μ L do sobrenadante foram adicionados a 200 μ L de solução-reação contendo CDNB 3 mM (diluído em etanol 98%) e GSH 3 mM. A atividade da GST foi quantificada em intervalos de 10 s durante 1 min, em espectrofotômetro a 340 nm e expressa em nmoles/mg de proteína/min.

3.18.5 Quantificação dos níveis da atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx)

Triplicatas de um volume de 10 μ L do sobrenadante ou água destilada (para o branco) foi misturado com 130 μ L de solução-reação (3,08 mM de azida de sódica, 0,31 mM de β -NADPH, 1,54 unidades/mL de glutathiona redutase de levedura e 3,08 mM de GSH em 100 mM de tampão fosfato de sódio, pH 7,0) em uma placa de 96 poços. Após 2 min de estabilização, a reação foi iniciada pela adição de 60 μ L de peróxido de hidrogênio 5 mM em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,0. O decréscimo de absorbância foi imediatamente medida a 340 nm por 1 min em intervalos de 10 s. A atividade da GPx foi expressa em mmoles/mg de proteína/min. (LAWRENCE e BURK, 1976).

3.19 AVALIAÇÃO DA SECREÇÃO GÁSTRICA

Esse protocolo experimental foi realizado de acordo com SHAY e colaboradores em 1945. Os animais foram mantidos em jejum de 18 h com acesso livre a água. Os animais receberam veículo (água + Tween 80 0,5% - 0,1 mL/100 g, v.o), SE-AE (0,15 mg/kg, v.o, i.p ou i.d) ou omeprazol (40 mg/kg, v.o). Os tratamentos pela via oral foram realizados 60 min antes do início da cirurgia, enquanto que os tratamentos pela via intraperitoneal foram realizados 30 min antes do início da cirurgia e os intraduodenais no momento da cirurgia. Para a ligadura pilórica, as ratas foram anestesiadas com xilazina e cetamina (10 e 5 mg/kg, i.p., respectivamente) e através de uma incisão de cerca de 2 cm no abdômen, o estômago foi localizado e realizada a ligadura do esfíncter pilórico com auxílio de um fio de sutura, a parede abdominal foi suturada após esse procedimento. Transcorrido 4 h da cirurgia os animais foram eutanaziados e seus estômagos removidos após pinçamento do esôfago para evitar perda do conteúdo ácido secretado. O estômago foi lavado com água, seco com uma gaze e aberto ao longo da curvatura menor. A mucosa foi lavada com 3 mL de água destilada, recolhendo-se o suco gástrico e o conteúdo proveniente da lavagem da mucosa em tubos de ensaio para a centrifugação (1.500 rpm, durante 20 min). Após a centrifugação, o volume gástrico (mL) foi quantificado em proveta e a acidez total ($\text{mEq}[\text{H}^+]/\text{mL}$) foi quantificada por

titulação simples com NaOH 0,1 N, utilizando fenolftaleína 2% como indicador ácido-base (DOMER, 1971).

3.20 QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE PÉPTICA

A pepsina é uma enzima digestiva que atua sobre proteínas no processo de quimificação e é ativada em meio ácido pela conversão do pepsinogênio em pepsina. Assim como o ácido clorídrico, a pepsina também é considerada um fator agressor endógeno da mucosa gástrica. Esta metodologia foi realizada de acordo com o descrito por ANSON (1938) com algumas modificações. Assim, amostras (100 µL) de suco gástrico foram coletadas como descrito anteriormente (item 4.20), transferidas para tubos de polipropileno e incubadas com 500 µL de solução de albumina bovina (5 mg/mL HCl 0,06N) a 37 °C por 10 min. A reação foi interrompida, adicionando-se 500 µL de ácido tricloroacético 10% e os tubos foram centrifugados a 4000 rpm durante 20 min em microcentrífuga de alta velocidade (5415 R – Eppendorf do Brasil, São Paulo, SP, BR). A seguir, 1 mL do sobrenadante foi separado e alcalinizado com 5 mL de carbonato de sódio 0,55 M. Posteriormente, 500 µL de reagente de Folin 1 N foi adicionado aos tubos, que foram incubados por 30 minutos em temperatura ambiente. Após o período de incubação, alíquotas de 300 µL de cada tubo foram transferidas para placa de 96 poços e a absorbância das soluções foi determinada por leitura espectrofotométrica a 660 nm. Os valores individuais foram interpolados em uma curva padrão de tirosina (6,25–200 g/mL) e os resultados expressos em mmol de tirosina/mL/4 hrs.

3.21 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE GASTRINA

Os níveis séricos do hormônio gastrina foram medidos no sangue de animais não ulcerados e ulcerados com ácido acético, tratados com veículo (água + Tween 80 0,5% - 0,1 mL/100 g), omeprazol (20 mg/kg) ou a fração SE-AE (1,2 mg/kg) duas vezes ao dia, durante sete dias utilizando um kit comercial para detecção de gastrina no soro por imunoensaio

enzimático (Biorbyt, Cambridge, Cambridgeshire, UK) e seguindo as instruções do fabricante do kit.

3.22 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE DA H^+/K^+ -ATPASE

Para o isolamento e verificação da atividade da enzima H^+,K^+ -ATPase foi utilizado o estômago de coelho (*Oryctolagus cuniculus*) albino. O animal foi eutanaziado por uma dose letal de quetamina e xilazina (300 mg/kg e 30 mg/kg, respectivamente, intra-cardíaca), porém antes da eutanazia o animal foi anestesiado com quetamina e xilazina (100 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente, intra-muscular). O estômago foi removido, colocado imediatamente em banho de gelo, aberto pela curvatura maior, lavado e teve as regiões do antro e do fundo foram descartadas. A seguir realizou-se a separação da mucosa da região do corpo e procedeu-se o isolamento dos microssomos gástricos através da homogeneização do tecido da mucosa em tampão Tris.HCl 50 mM (pH 7,4) contendo sacarose 250 mM, $MgCl_2$ 10 mM, KCl 5 mM, EDTA 1 mM e coquetel de inibidores de protease 0,01%, na proporção de 5 volumes de tampão para cada grama de tecido. O homogenato produzido foi centrifugado a 5.000 rpm durante 20 min em microcentrífuga de alta velocidade refrigerada (5415 R – Eppendorf do Brasil, São Paulo, SP, BR), o precipitado descartado e o sobrenadante novamente centrifugado a 30.000 rpm durante 1 h em microcentrífuga de alta velocidade refrigerada (5415 R – Eppendorf do Brasil, São Paulo, SP, BR). Todos os procedimentos foram realizados à temperatura de 4 °C .

A próxima fase foi a de purificação da H^+/K^+ -ATPase e foi realizada por centrifugação em gradiente descontínuo de sacarose. O precipitado obtido da centrifugação de 30.000 rpm contendo as vesículas com H^+/K^+ -ATPase foi ressuspensionado em 3 mL de sacarose 250 mM, cuidadosamente transferido para um tubo com sacarose 30% e centrifugado novamente a 30.000 rpm por 1 h em uma micro-centrífuga de alta rotação (Himac CP 90B, Hitachi, Tóquio, Japão). Duas bandas pequenas e um precipitado foram obtidos. As membranas sedimentadas na superfície da solução de sacarose 30% foram coletadas obtendo-se, assim, os microssomos purificados contendo a enzima H^+/K^+ -ATPase gástrica (KUBO *et al.*, 1995). O material enzimático foi, então, congelado e guardado a -70 °C até o momento do uso.

O conteúdo de proteína presente na amostra foi determinado em placa de 96 poços com o reagente de Bradford, utilizando curva padrão de albumina (0,0625-1 mg/mL).

Na fase de caracterização da H^+/K^+ -ATPase, realizou-se o bloqueio específico da bomba de prótons pelo inibidor omeprazol (345 $\mu\text{g/mL}$), e a fim de descartar a presença de Na^+K^+ -ATPase utilizou-se a ouabaína (728 $\mu\text{g/mL}$), um inibidor específico de Na^+/K^+ -ATPase.

Finalmente a atividade ATPásica foi determinada mediante quantificação do fósforo inorgânico (P_i) liberado da hidrólise de ATP exógeno, na presença de K^+ , pela enzima. A reação foi iniciada pela adição de 37,5 μg de proteína enzimática a 500 μL de tampão Tris.HCl (pH 7,4) contendo cloreto de magnésio 2,5 mM, cloreto de potássio 20 mM e ATP 1 mM, na ausência e na presença das drogas a serem testadas. A reação foi encerrada após 20 min de incubação a 37 °C pela adição de 50 μL de ATC 50% e esfriamento rápido em banho de gelo. O fosfato inorgânico produzido foi determinado através da adição às amostras de 1,5 mL da solução reagente contendo de água (4,7 mL), ácido sulfúrico 10 N (0,7 mL), molibdato de amônio 2,4% (0,6 mL) e ácido ascórbico 10% (3 mL). As amostras foram incubadas por 20 min em banho-maria a 37 °C e a leitura da placa realizada em espectrofotômetro a 820 nm. O reagente foi preparado no momento do uso. A atividade enzimática foi calculada usando o coeficiente de extinção do P_i ($\epsilon = 11.000/\text{M}/\text{cm}$) (MURAKAMI et al., 1992). Para se verificar a ação da fração SE-AE sobre o funcionamento da enzima foram utilizadas as concentrações de 1, 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$, e todos os testes foram feitos em triplicata em duas ocasiões diferentes.

3.23 AVALIAÇÃO DO ESVAZIAMENTO GÁSTRICO

Para realização deste protocolo experimental, a indução do *Diabetes mellitus* foi realizada com descrito anteriormente (item 3.13). Decorridos 14, 28, 42 e 56 dias após a indução experimental do diabetes (valores de glicemia acima de 250 mg/dL), ratas com valores de glicemia superior a 250 mg/dL foram submetidas a um jejum sólido por 12 h, pesadas e receberam 1,4 mL do marcador colorido semi-sólido (vermelho de fenol 0,5 % em carboximetilcelulose 1,5 %) por via oral. Após 20 min os animais foram eutanaziados. A cavidade abdominal foi aberta e com o piloro e a parte distal do esôfago pinçados o estômago

foi retirado com seu conteúdo, aberto e lavado com 7 mL de água destilada. O conteúdo gástrico coletado foi centrifugado a 1500 rpm, 30 min. A 150 µL do sobrenadante foi adicionado igual volume de NaOH 0,025 N (pH 12) e a solução obtida foi lida em espectrofotômetro a 560 nm. Também foi realizado uma curva controle (tempo zero), através de um grupo de 6 animais que receberam vermelho de fenol (0,5 mg/mL) e logo após foram sacrificados, sendo assim considerados com 0 % de esvaziamento. Os resultados foram expressos em porcentagem de esvaziamento gástrico em relação ao grupo controle tempo zero (SCARPIGNATO *et al*, 1980).

Em segundo experimento, ratas diabetizadas há 14 dias, submetidas a um jejum sólido por 12 h, pesadas e separadas em grupos de 6 animais, foram tratadas com veículo (água + Tween 80 0,5% - 0,1 mL/100 g, v.o), insulina (6 UI/ dia, s.c), domperidona (20 mg/kg,v.o), ácido ascórbico (300 mg/kg, v.o) ou SE-AE (1,0; 10 e 100 mg/kg,v.o) uma vez ao dia, durante 42 dias. Apenas o tratamento com insulina foi iniciado a partir do terceiro dia de indução do diabetes. Ao final do período de tratamento, a glicemia em jejum foi mensurada e amostras sangüíneas foram coletadas da veia caudal de cada animal para mensuração dos níveis de hemoglobina glicada utilizando um kit comercial (Glycohemoglobin HbA₁ Test SP, In vitro, Itabira, MG, BR). Transcorrido uma hora, receberam 1,4 mL de um marcador colorido semi-sólido (vermelho de fenol 0,5 % em carboximetilcelulose 1,5 %) por via oral e 20 min após foram eutanaziadas e a mensuração da taxa de esvaziamento gástrico foi realizada como descrito acima.

A fim de verificar o efeito de uma única administração da fração SE-AE no esvaziamento gástrico de ratas normoglicêmicas e diabéticas um terceiro experimento foi realizado. Assim, ratas normoglicêmicas e diabéticas submetidas a um jejum sólido por 18 h, pesadas, separadas em diferentes grupos de 6 animais, foram tratadas por via oral com veículo (água + Tween 80 0,5% - 0,1 mL/100 g), SE-AE (1 mg/kg) ou domperidona (20 mg/kg). Após estes procedimentos, os animais foram eutanaziados e a mensuração da taxa de esvaziamento gástrico foi realizada como descrito anteriormente.

3.24 ESTÔMAGO ISOLADO DE RATOS

3.24.1 Preparação do tecido

Ratas diabetizadas há 56 dias tratadas diariamente com veículo (água + Tween 80 0,5% - 0,1 mL/100 g, v.o), ácido ascórbico (300 mg/kg, vo) ou SE-AE (1 mg/kg, v.o) durante 42 dias, e ratas diabetizadas há 56 dias tratadas com insulina (6 UI/dia) durante 53 dias foram submetidas a um jejum sólido por 12 h e eutanaziadas. O estômago foi retirado, limpo, aberto no sentido da curvatura menor e o piloro e fitas sero-musculares das paredes anterior e posterior do fundo gástrico medindo aproximadamente 0,5 cm de largura e 2 cm de comprimento foram coletadas. O maior eixo dos segmentos foi paralelo à orientação das fibras musculares circulares. Essas tiras foram acondicionadas, através de hastes conectadas a transdutores, em cubas de vidro contendo solução nutritiva de Krebs em mM: NaCl 110,8; KCl 5,9; NaHCO₃ 25,0; MgSO₄ 1,07; CaCl₂ 2,49; NaH₂PO₄ 2,33 e glicose 11,51; aerados com carbogênio (95% O₂/5% CO₂), mantidos a uma temperatura de 37 °C. As preparações teciduais foram submetidas a uma tensão basal de 1 g, seguido por um período de equilíbrio de 1 h. Durante este período a solução de Krebs foi renovada a cada 20 min.

3.24.2 Protocolo experimental

Primeiramente, contrações tônicas induzidas por aumento da concentração de K⁺ na solução de Krebs foram realizadas. Para isso, uma solução de Krebs com 40 mM de K⁺ foi preparada através da troca equimolar de NaCl por KCl no preparo da solução de Krebs normal. Posteriormente, foram realizadas curvas cumulativas concentração-resposta (CCR) para acetilcolina (Ach) (10⁻¹⁰- 10⁻⁶M) e para nitroprussiato de sódio (SNP) (10⁻¹⁰- 10⁻⁵M). Contudo, os tecidos foram contraídos com sulfato de bário (BaSO₄) 10 mM antes da CCR de relaxamento para SNP, que só foi realizada após sustentada contração. Entre cada CCR construída, as amostras teciduais eram submetidas a um período de estabilização de 1 h, durante o qual a solução de Krebs foi renovada a cada 20 min.

Finalmente, em outro conjunto de experimentos, nos 45 min finais de um novo período de estabilização de 1 h, foram adicionados a cuba 10 μ M de guanetidina (GNT) e 10 μ M atropina (ATR) para bloquear respostas adrenérgicas e colinérgicas, após estabilização os tecidos foram contraídos com sulfato de bário (BaSO_4) 10 mM e após uma contração sustentada, foram submetidos à estimulação elétrica de campo (EEC) aplicada na forma de trens de pulsos retangulares de 1 ms de duração e intensidade de 20 V por 10 s, em frequência de 8 Hz (Panlab stimulator model LE 12406 TC, Panlab, Espanha). Ainda neste protocolo, para confirmar relaxamento nitrérgico, após 45 min de estabilização, as amostras foram incubadas com 10^{-4} M de L-NAME e um novo relaxamento foi validado sob as mesmas condições que as anteriores.

Todos os registros foram obtidos por meio de transdutores isométricos (modelo TRI 210 da Letica Scientific Instruments e F 1202 da CB Sciences, EUA), acoplados a um amplificador de sinais (Modelo ML 130, MacLab ADI Instruments, Austrália) conectados a um computador contendo um software específico de integração (Chart v 4.00, PowerLab/MacLab, ADI Instruments, Austrália).

3.25 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DA ENZIMA NOS-1

A expressão da enzima NOS1 foi avaliada como descrito por GANGULA e colaboradores (2007). Amostras teciduais do corpo gástrico, provenientes de ratas diabéticas há 56 dias e tratadas diariamente com veículo (água + Tween 80 0,5% - 0,1 mL/100 g, v.o), ácido ascórbico (300 mg/kg, vo) ou SE-AE (1,0 mg/kg, v.o) durante 42 dias, e ratas diabetizadas há 56 dias tratadas com insulina (6 UI/dia) durante 53 dias foram pulverizadas e transferidas para tubos com tampão de lise [HEPES 10 mM, pH de 7,9, contendo: 1,5 mM de MgCl_2 , 10 mM de KCl, 0,5 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), 0,5 mM de ditioneitol, 50 mM de NaF, 2 mM de Na_3VO_4 e 10 μ g/ml de aprotinina], para obtenção do homogenato. O homogenato foi centrifugado a 10000 rpm por 30 min e o sobrenadante coletado e utilizado como fração citossólica. A determinação da concentração de proteínas do sobrenadante de cada amostra foi realizada utilizando reagente de Bradford utilizando albumina de soro bovino como padrão (1,0 – 0,0625 mg/kg). As amostras obtidas (40 μ g de proteína por poço) foram misturadas com tampão de amostra 5 vezes concentrado

(Tris-HCl 150 mM, pH 6,8, contendo: β -mercaptoetanol 15%, SDS 6%, azul de bromofenol 0,3%), fervidas por 5 min e submetidas à eletroforese em gel desnaturante e SDS-poliacrilamida e transferidas para membrana de fluoreto de polivinilideno. Após a transferência, a membrana foi bloqueada e posteriormente incubada com anticorpo policlonal para nNOS 1:200 (Santa Cruz Biotechnology, Dalas, TX, USA) ou β -tubulina 1:10000 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA), durante 16 horas a 4 °C. A visualização das proteínas foi realizada utilizando anticorpo secundário específico conjugado a peroxidase e as bandas imunorreativas foram visualizadas usando-se um kit de quimioluminescência (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Inglaterra) e filme radiográfico segundo recomendações do fabricante.

3.26 AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS QUANTITATIVOS DOS NEURÔNIOS DO PLEXO MIOENTÉRICO GÁSTRICO

Ratas diabetizadas há 56 dias tratadas diariamente com veículo (água + Tween 80 0,5% - 0,1 mL/100 g, v.o), ácido ascórbico (300 mg/kg, vo) ou SE-AE (1,0 mg/kg, v.o) durante 42 dias e ratas diabetizadas há 56 dias tratadas com insulina (6 UI/dia) durante 53 dias foram submetidas a um jejum sólido por 12 h e eutanaziadas. Logo após, os estômagos foram retirados e submetidos à técnica histoquímica para marcação da enzima NADPH-diaforase, segundo SCHERER-SINGLER e colaboradores (1983). Para tanto, os estômagos foram lavados, preenchidos com tampão fosfato 100 mM (pH 7,4) e tiveram o piloro e a cardia fechadas por ligaduras utilizando fios de sutura, sendo então imersos e fixados em paraformaldeído a 4%, preparado em tampão fosfato 100 mM (pH 7,4) por 30 min. A seguir, os estômagos foram imersos em solução de Triton X-100[®] 0,3%, dissolvido em tampão fosfato 100 mM (pH 7,4) por 10 min, e posteriormente lavados por dez vezes (10 min cada) em tampão fosfato 100 mM (pH 7,4). Em seguida, foram imersos no meio de incubação, para a evidenciação neuronal contendo β -NADPH 600 μ M, NBT 600 μ M, Triton X-100[®] 0,3% dissolvidos em Tris-HCl 280 mM (pH 7,6), durante 60 min. A reação foi monitorada sob estereomicroscópio. Os segmentos foram lavados três vezes (5 min cada), em solução tampão fosfato 100 mM (pH 7,4) e a interrupção da reação ocorreu com paraformaldeído 4% em solução fosfato 100 mM (pH 7,4). Após isso a superfície gástrica foi fotografada para

posterior mensuração da sua área com auxílio do software Image Tool[®] 3.0. Posteriormente, realizou-se a microdissecção sob estereomicroscópio com transluminação, retirando-se a túnica mucosa e a tela submucosa. Em seguida, os preparados totais foram desidratados em uma série ascendente de álcoois, diafanizadas em xilol e montadas entre lâmina e lamínula.

A análise do laminário foi realizada na região glandular de cada estômago, correspondendo ao corpo e antro gástrico, tanto em regiões próximas a pequena curvatura como próximas a grande curvatura do órgão.

A quantificação dos neurônios mientéricos foi realizada por amostragem em 40 campos microscópios de cada uma das regiões supracitadas. Todas as análises foram realizadas em microscópio óptico trinocular (Olympus BX 40, Olympus Optical do Brasil, São Paulo, SP, BR) e fotografadas em câmera de captura (Olympus DP 71, Olympus Optical do Brasil, São Paulo, SP, BR) com objetiva de 40X. Todos os neurônios de cada campo foram contados, considerando-se os meio-neurônios de campos alternados. A área de cada campo microscópico era de 95,87 mm².

3.27 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA FORMAÇÃO DOS PRODUTOS FINAIS DA GLICAÇÃO AVANÇADA (AGES)

O efeito da fração SE-AE sobre a formação dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) foi mensurado como descrito por MCINTYRE e colaboradores (2009). Para tanto, 2 mL de um meio reacional formado por tampão fosfato monobásico monohidratado (NaH₂PO₄ . H₂O, pH 7.4, 100 mM), glicose (100 mM), frutose (100 mM) e albumina de soro bovino (1 mg/mL) foram incubados com veículo (água + Tween 80 0,5%), aminoguanidina (1mM), ácido ascórbico (1; 10 e 100 µg/mL) ou a fração SE-AE (1; 10 e 100 µg/mL) em tubos de polipropileno, no escuro, a 37 °C, durante 14 dias. Adicionalmente, para corrigir a autofluorescência emitida por qualquer analito, meios reacionais sem albumina também foram incubados. Por fim, meios reacionais sem glicose e frutose incubados com veículo foram utilizados como um controle de autofluorescência para a albumina.

Posteriormente ao período de incubação, alíquotas de 300 µL de cada amostra foram transferidas para placa de 96 poços para mensuração da fluorescência em espectrofluorímetro

utilizando comprimento de onda com excitação de 488 nm e emissão de 520 nm. Todos os testes foram feitos em triplicata em duas ocasiões diferentes.

3.28 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE SEQUESTRADORA DO RADICAL LIVRE 2,2-DIFENIL-1-PICRIL-HIDRAZILA (DPPH)

A atividade da fração SE-AE em reduzir o radical livre estável DPPH foi determinada através de medidas de alteração da absorbância a 517 nm, de acordo com o método descrito por BLOIS (1958) e por CHEN e colaboradores (2004), com algumas modificações. O sistema de reação foi constituído de 750 µL de solução teste (fração) e 250 µL de solução metanólica de DPPH (1 mg em 25 mL). Após 5 minutos, o decréscimo da absorbância foi medido. Solução do agente redutor ácido ascórbico (50 µg/mL) foi utilizada como controle positivo do teste e como grupo controle negativo foi adicionado água com 0,32 % de DMSO (veículo).

3.29 EXPRESSÃO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram representados como as médias \pm erro padrão das médias (E.P.M.). As diferenças entre as médias foram determinadas através da análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias seguida pelo teste post hoc de Bonferroni, quando aplicável. As análises foram realizadas usando o Programa para *Windows*, *GraphPad Prism* versão 5.0 (*GraphPad Software*, San Diego, EUA). Um valor de P menor que 0,05 foi considerado significativo.

4. RESULTADOS

4.1 IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA

A identificação química dos compostos presentes nas preparações de bardana utilizadas neste trabalho já foram descritas por CARLOTTO (2013). Contudo uma vez que novas preparações foram produzidas para a execução deste trabalho, a identificação química foi novamente realizada para atestar a composição dos extratos e frações. De fato, a semelhança do identificado por CARLOTTO (2013), podemos ver na figura 7A, a presença de muitos compostos no extrato SE, que foram identificados através do tempo de retenção, absorbâncias UV e espectro de massa como sendo o ácido 5-*O*-cafeoilquínico (pico 8), ácido 3-*O*-cafeoilquínico (pico 11), ácido 4-*O*-cafeoilquínico (pico 12), ácido 3,4-*O*-dicafeoilquínico (pico 21), ácido 3,5-*O*-dicafeoilquínico (pico 25) e o ácido 4,5-*O*-dicafeoilquínico (pico 27), os quais também estão presentes em um extrato de *Ilex paraguariensis* utilizado como padrão. Contudo, ácidos monocafeoilquínicos e dicafeoilquínicos que não estão presentes no extrato de *I. paraguariensis* também foram identificados no SE, entre eles os compostos representados pelos picos 13 e 23. Com auxílio de um padrão de referência, o pico 13 foi identificado como cinarina (ácido 1,5-*O*-dicafeoilquínico), mas o pico 23 ainda continuou não identificado, podendo ser o ácido 1,3-*O*-dicafeoilquínico ou 1,4-*O*-dicafeoilquínico. Glicosídeos flavônicos e outros picos menores foram identificados com base na absorbância UV e espectro de massa.

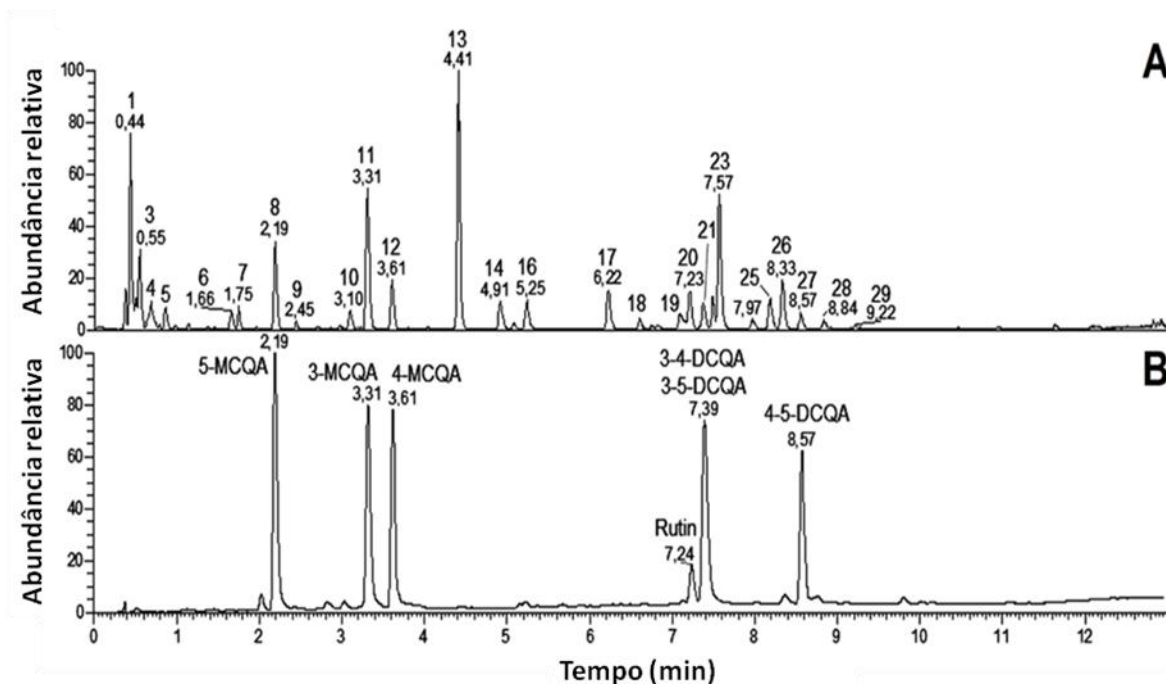


FIGURA 7: Cromatograma UHPLC-PDA (200 - 400 nm) do extrato SE (A) e de um extrato de referência de *Ilex paraguariensis* (B).

A análise cromatográfica das frações obtidas através do particionamento do extrato SE demonstrou que muitos carboidratos concentraram-se na fração aquosa (dado não mostrado). Tanto a fração solúvel em acetato de etila (SE-AE) , como a fração butanólica (SE-B) concentraram ácidos cafeoilquínicos, sendo que os dicafeoilquínicos permaneceram na fração ativa SE-AE (Fig. 8A) e os monocafeoilquínicos na fração SE-B (Fig. 8B). Entretanto, a cinarina (ácido 1,5-*O*-dicafeoilquínico) foi uma curiosa exceção que foi separada dos outros ácidos dicafeoilquínicos e permaneceu na fração butanólica (pico 13) (Fig.8B). O principal composto da fração SE-AE foi o ácido dicafeoilquínico ainda desconhecido (Fig. 8A).

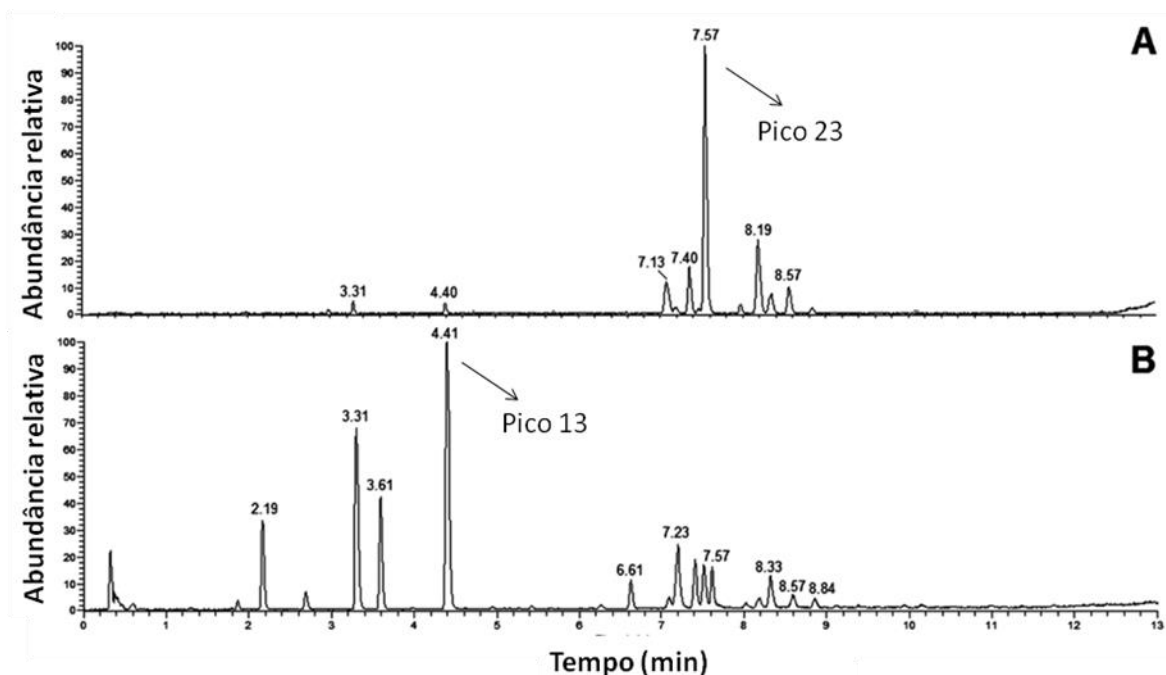


FIGURA 8: Comparação por UHPLC-PDA (325 nm) da fração SE-AE (A) e SE-B (B)

Como descrito por CARLOTTO (2013), considerando os ácidos dicafeoilquínicos habituais e que outras possibilidades foram excluídas por comparação com padrão de referência, duas possibilidades estruturais podem explicar o composto representado pelo pico 23: o ácido 1,4-O-dicafeoilquínico ou o 1,3-O-dicafeoilquínico.

Desta forma a cada isolamento do pico 23 para obtenção do composto isolado, a identificação e isolamento de tal composto era efetuado por UHPLC-PDA-MS) (Fig. 9A) e NMR (^1H , COSY, HSQC e HMBC) (Fig.10).

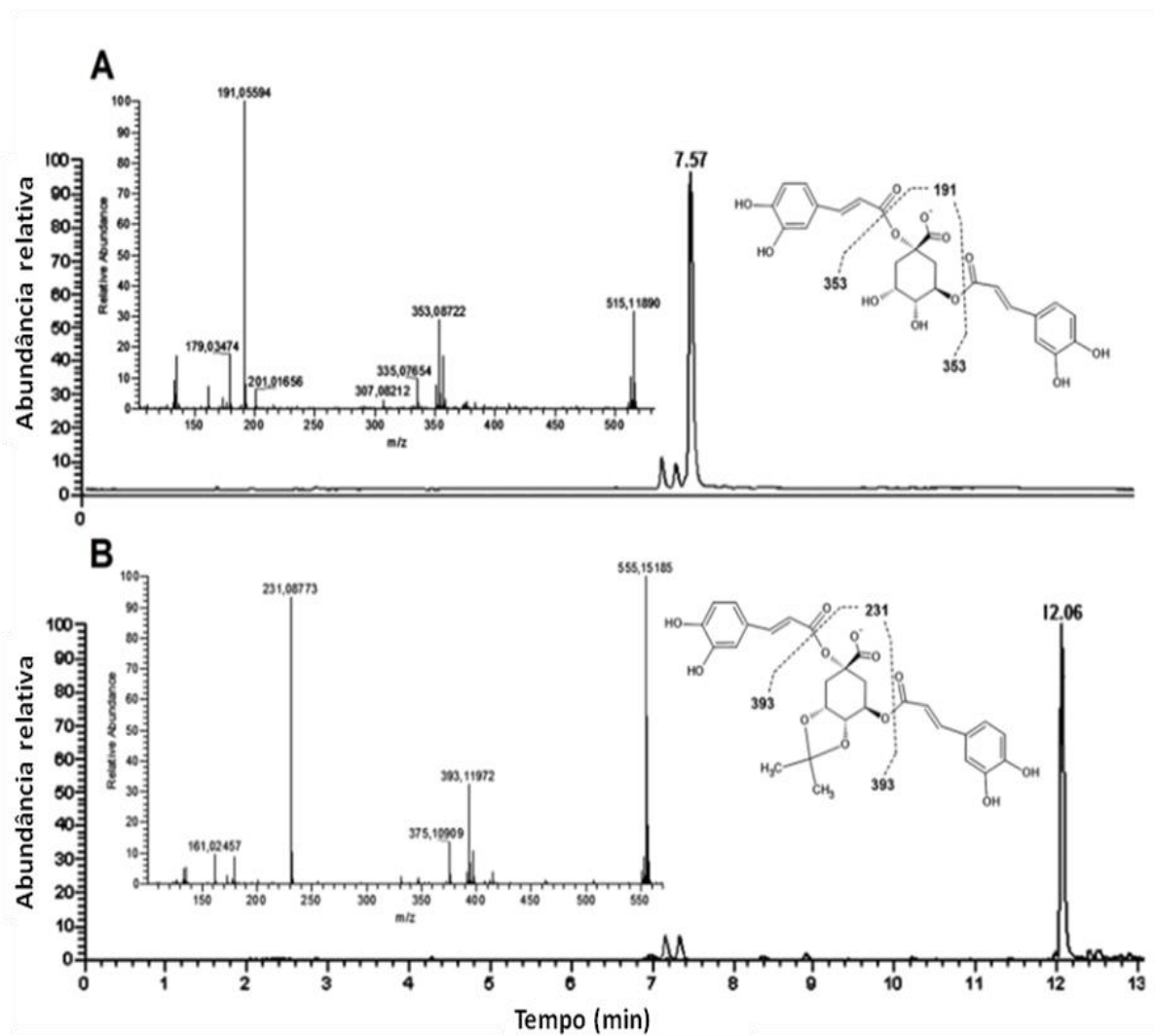


FIGURA 9: Comparação entre o original (A) e o derivado isopropilideno (B) do ácido 1,3-*O*-dicafeoilquínico por UHPLC-MS.

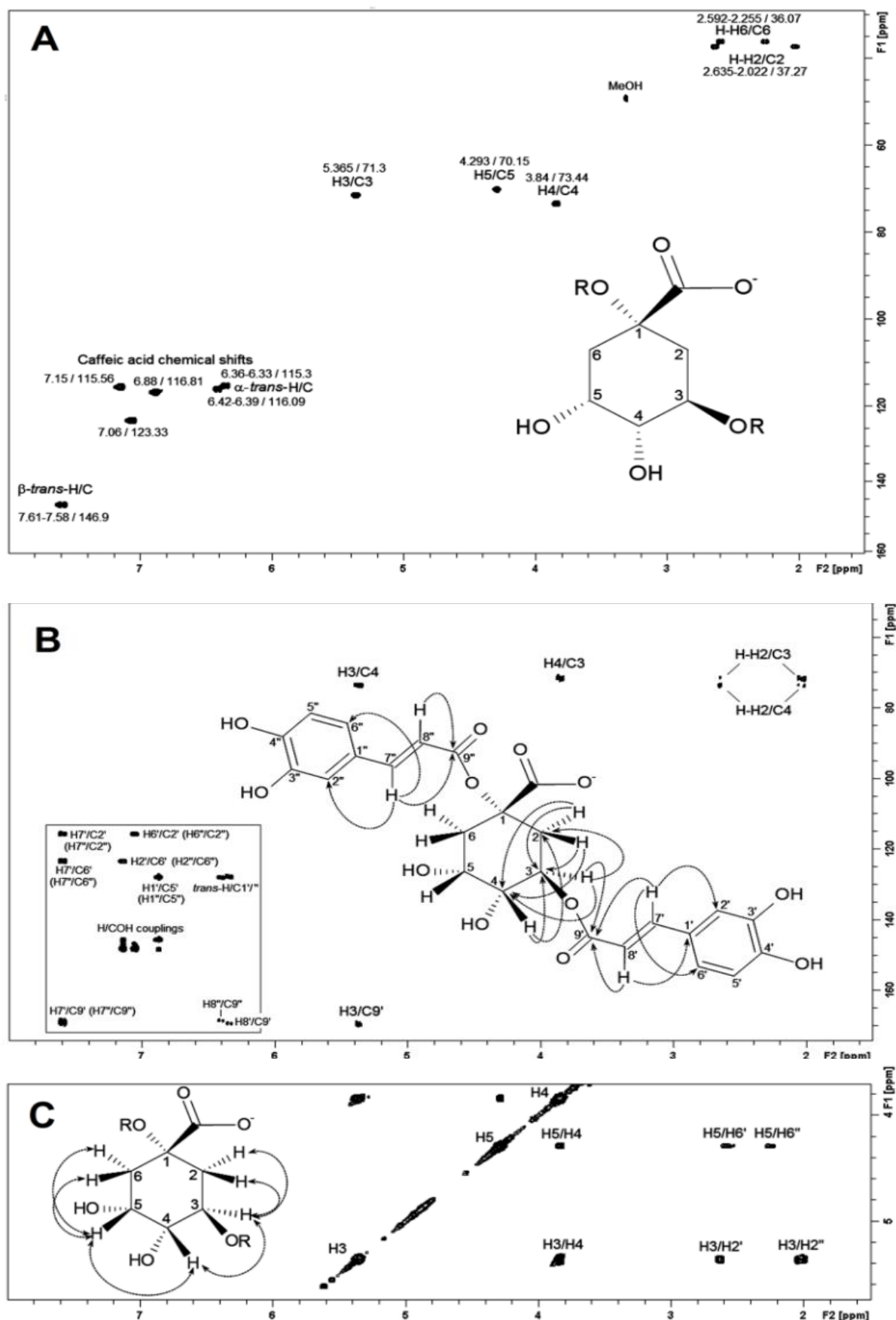


FIGURA 10: Análise por RMN do pico 23 purificado. (A) correlações HSQC suportadas por sinais HMBC (B) e COSY (C). Setas indicam as correlações entre ν_{ic} 1H-1562 H em COSY, e 1H-13563 C longo alcance em experimentos HMBC.

A cada amostra de ácido 1,3-O-dicafeoilquínico obtida, uma alíquota era separada para a confirmação do mesmo através da acetalação do composto, como efetuado por CARLOTTO (2013).

A reação de acetalação origina derivados de isopropilideno (SOUZA *et al.*, 2011) e uma exigência para que a reação ocorra é a presença de hidroxilas vicinais livres na configuração *cis*. O ácido 1,3-O-dicafeoilquínico permite a formação do derivado de 4-5-O-isopropilideno, ao passo que 1,4-O-dicafeoilquínico não. Da mesma forma que realizado por CARLOTTO (2013), o produto da reação de acetalação foi analisado cromatograficamente e foi observada ausência do pico 23 em seu tempo de retenção inicial (7,57 min) e a emergência de um novo pico em 12,06 min, que pode ser atribuído à reação positiva, uma vez que a inserção de um grupo isopropilideno cetar diminui a polaridade molecular e aumenta o tempo de retenção (Fig. 9B). A avaliação da absorbância UV e do espectro de massa foram utilizadas para a confirmação da reação positiva do composto representado pelo pico 23 e em todas as amostras analisadas confirmou que o composto presente era o ácido 1,3-O-dicafeoilquínico, o qual possui hidroxilas viscinais (Fig. 11).

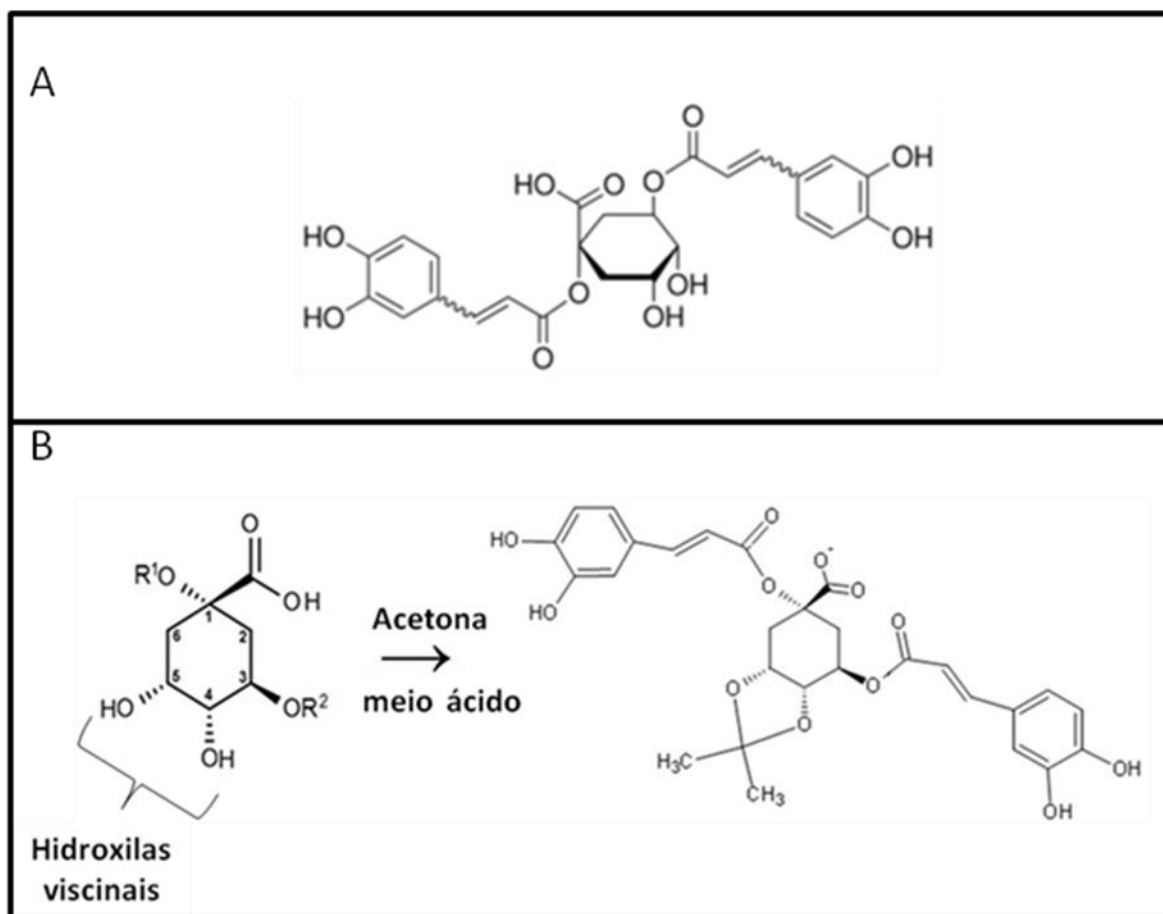


FIGURA 11: Fórmula estrutural do ácido 1,3-*O*-dicafeoilquínico (A) e reação de acetalação do ácido 1,3-*O*-dicafeoilquínico com formação do derivado 4,5-*O*-isopropilideno (B). $R^1 = R^2 = \text{cafeoil} \rightarrow$ ácido 1,3-*O*-dicafeoilquínico.

4.2 TESTE GERAL DE ATIVIDADES E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA EM CAMUNDONGOS

A administração do SE nas doses de 0,005 e 0,050 g/kg por via oral e na dose de 0,005 g/kg por via intraperitoneal não provocou nenhuma alteração comportamental nos camundongos em comparação aos animais tratados com veículo (v.o) ou solução salina (i.p) durante todo o período de observação.

Cinco min após os tratamentos com 5 g/kg ou 0,500 g/kg de SE (v.o) ou com 5; 0,500 ou 0,050 g/kg de SE (i.p) apresentaram alterações respiratórias, ereção pilomotor, redução na locomoção, passividade, perda da atividade exploratória, tremores e convulsões, sendo que estas alterações persistiram por até 60 min após o início dos experimentos. Além disso, 33% (n=6) dos animais que receberam SE 5 g/kg (v.o.) e 83% tratados com 5 g/kg (i.p.) morreram durante a 1ª h de observação.

Vinte e quatro horas após os tratamentos, todos os animais apresentaram comportamentos semelhantes aos animais tratados com veículo ou solução salina e nenhuma morte foi observada por todo o período experimental restante.

A DL₅₀ obtida quando o SE foi administrado pela via oral foi de 10,8208 g/kg (intervalo de confiança de 95%: 1,4416–81,2199 g/kg) e para a administração intraperitoneal de SE foi de 1,6266 g/kg (intervalo de confiança de 95%: 0,4409–6,0006 g/kg).

4.3 ATIVIDADE GASTROPROTETORA

4.3.1 Efeito da administração oral do SE e frações sobre úlceras gástricas induzidas por etanol em ratas.

Como esperado, a administração oral de etanol 98% promoveu a formação de lesões em $205,5 \pm 17,7 \text{ mm}^2$ da mucosa gástrica de animais pré-tratados apenas com veículo. Confirmando os dados obtidos por CARLOTTO (2013), o pré-tratamento oral dos animais com SE nas doses de 1, 10 e 100 mg/kg reduziu a extensão das lesões gástricas de maneira dose dependente com uma DE₅₀ de 3,6 mg/kg (Fig 12A.). Diante disso, para este experimento, as doses das frações foram estabelecidas em relação a DE₅₀ do SE (3,6 mg/kg) e o rendimento de cada uma das frações em relação ao SE. Sendo assim, as doses utilizadas foram 0,01 mg/kg para a fração clorofórmica (SE-C), 0,30 mg/kg para a fração butanólica (SE-B), 0,15 mg/kg para a fração solúvel em acetato de etila (SE-AE), 0,29 mg/kg para a fração emulsionada em acetato de etila (SE-EAE) e 1,68 mg/kg para a fração residual aquosa (SE-A). De todas as frações testadas, somente a fração SE-AE reduziu as lesões gástricas. Assim, o pré-tratamento

com esta fração (0,15 mg/kg, v.o) reduziu a área das lesões em 66% quando comparado ao grupo ulcerado tratado com veículo (Vei: $222 \pm 35,2 \text{ mm}^2$) (Fig.12B). O controle positivo, omeprazol (40 mg/kg, v.o) reduziu a as úlceras gástricas em até 96% (Fig.12).

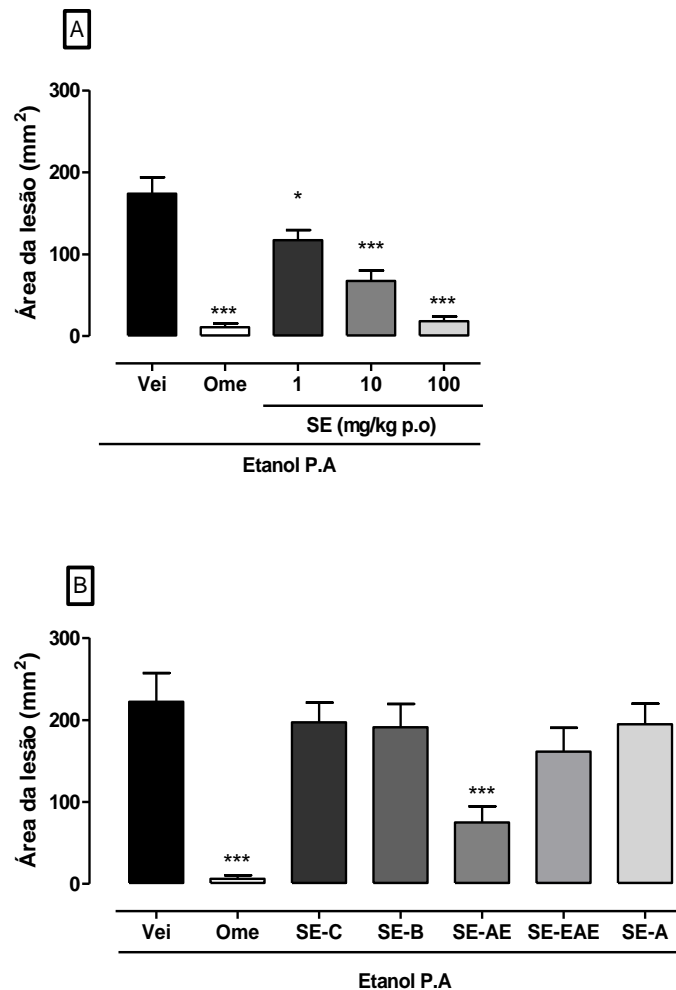


FIGURA 12: Efeito da administração oral do extrato SE e de suas frações sobre as lesões gástricas induzidas por etanol. No painel A, os animais receberam veículo (Vei: 0,1mL/100g), omeprazol (Ome: 40 mg/kg) ou SE (1, 10 e 100 mg/kg). No painel B, os animais receberam veículo (Vei: 0,1mL/100g), omeprazol (Ome: 40 mg/kg), frações SE-C (0,01 mg/kg), SE-B (0,30 mg/kg), SE-AE (0,15 mg/kg), SE-EAE (0,29 mg/kg) ou SE-A (1,68 mg/kg). Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. (n = 6 - 8). *P<0,05 e ***P<0,001 quando comparado ao grupo tratado com veículo (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

4.3.2 Efeito da administração intraperitoneal do SE e da fração SE-AE sobre úlceras gástricas induzidas por etanol em ratas.

A administração intraperitoneal de doses menores de SE (0,1 e 1 mg/kg) reduziu a área das lesões gástricas em 89%, 88%, 91% quando comparado ao grupo ulcerado tratado com veículo (Vei: $194 \pm 22,3 \text{ mm}^2$) (Fig. 13A). Da mesma forma, doses menores da fração SE-AE (0,0015 e 0,015 mg/kg, i.p) também reduziu a área das lesões gástricas em 62% e 70% quando comparado ao grupo ulcerado tratado apenas com veículo (Vei: $138 \pm 26,7 \text{ mm}^2$) (Fig. 13B). O controle positivo deste ensaio, omeprazol (40 mg/kg, v.o) reduziu a extensão das úlceras gástricas induzidas por etanol em até 95% (Fig. 13).

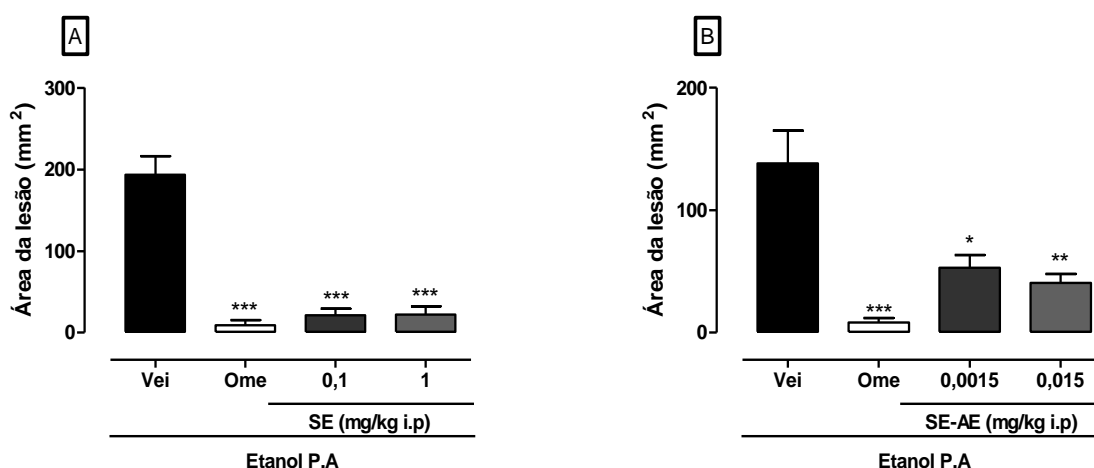


FIGURA 13: Efeito da administração intraperitoneal do extrato SE e da fração SE-AE sobre as lesões gástricas induzidas por etanol. No painel A, os animais receberam veículo (Vei: 0,1mL/100g), omeprazol (Ome: 40 mg/kg) ou SE (0,1; 1 e 10 mg/kg). No painel B, os animais receberam veículo (Vei: 0,1mL/100g), omeprazol (Ome: 40 mg/kg) ou a fração SE-AE (0,015 mg/kg e 0,0015 mg/kg). Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. (n = 6). *P<0,05, ** p <0,01 e ***P<0,001 quando comparado ao grupo tratado com veículo (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

4.3.3 Efeito da administração oral do ácido 1,3-*O*-dicafeoilquínico isolado da fração SE-AE sobre úlceras gástricas induzidas por etanol em ratas.

A administração do ácido 1,3-dicafeoilquínico isolado da fração SE-AE (57 µg/kg, v.o), mas não do ácido 1,5-dicafeoilquínico (Sigma-Aldrich) (57 µg/kg, v.o), reduziu a área das lesões gástricas induzidas por etanol em 75% quando comparado ao grupo ulcerado tratado apenas com veículo (Vei: $104 \pm 13,0 \text{ mm}^2$) (Fig. 14). O controle positivo deste ensaio, omeprazol (40 mg/kg) também reduziu a extensão das úlceras gástricas induzidas por etanol em até 99% (Fig. 14). A dose dos compostos foi calculada de acordo com o rendimento dos mesmos na fração SE-AE e a DE_{50} teórica da referida fração (0,15 mg/kg).

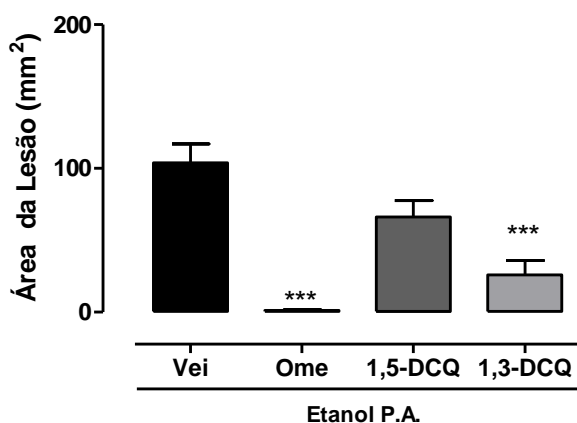


FIGURA 14: Efeito da administração oral do ácido 1,3-dicafeoilquínico isolado da fração SE-AE sobre as lesões gástricas induzidas por etanol. Os animais foram tratados com veículo (Vei: 0,1mL/100g), omeprazol (Ome: 40 mg/kg), ácido 1,3-dicafeoilquínico isolado da fração SE-AE (1,3-DCQ: 5.7 µg/kg) ou ácido 1,5-dicafeoilquínico (Sigma-Aldrich) (1,5-DCQ: 57 µg/kg). Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M. (n = 6). ***P<0,001 quando comparado ao grupo tratado com veículo (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

4.3.4 Efeito da fração SE-AE sobre úlceras gástricas induzidas por etanol em ratas previamente tratadas com N-etilmaleimida (NEM) ou indometacina.

A administração da fração SE-AE (0,15 mg/kg, v.o) em animais pré-tratados com NEM (10 mg/kg, i.p) reduziu a extensão das lesões gástricas em 66%, quando comparados com animais tratados com veículo (Vei: $165 \pm 16,7 \text{ mm}^2$) (fig 15A). Contudo, a fração SE-AE (0,15 mg/kg, v.o) não reduziu as lesões gástricas em animais pré-tratados com indometacina (10 mg/kg, i.p) quando comparados com animais que receberam veículo (Vei: $97 \pm 14,4 \text{ mm}^2$) (fig 15B).

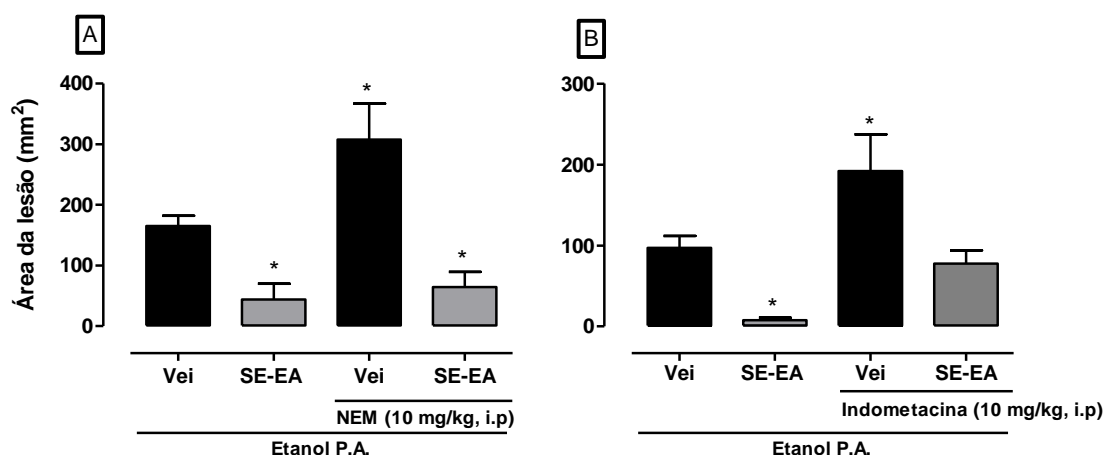


FIGURA 15: Efeito da administração oral da fração SE-AE sobre as lesões gástricas induzidas por etanol em ratas previamente tratadas com NEM ou indometacina. A: Os animais receberam NEM (10 mg/kg, i.p) ou salina (i.p) e então tratados com veículo (Vei: 0,1mL/100g) ou a fração SE-AE (0,15 mg/kg). B: Os animais receberam indometacina (10 mg/kg, i.p) ou salina (i.p) e então foram tratados com veículo (Vei: 0,1mL/100g) ou a fração SE-AE (0,15 mg/kg). Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. (n = 6). *p < 0,05 quando comparado ao grupo ulcerado tratado com veículo que não recebeu NEM ou indometacina. (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

4.3.5 Efeito da fração SE-AE sobre úlceras gástricas induzidas por indometacina em ratas.

A administração oral de indometacina (80 mg/kg) ocasionou a formação de lesões gástricas em $48 \pm 3,5 \text{ mm}^2$ da mucosa gástrica de animais pré-tratados com veículo. O pré-tratamento oral com a fração SE-AE na dose de 0,15 e 1,5 mg/kg foi capaz de reduzir a extensão das lesões gástricas em 64% e 80%. Da mesma forma, o pré-tratamento com omeprazol (40 mg/kg) ou PGE_2 (20 $\mu\text{g/kg}$) reduziu a extensão das úlceras gástricas em 99% e 98%, respectivamente (Fig. 16).

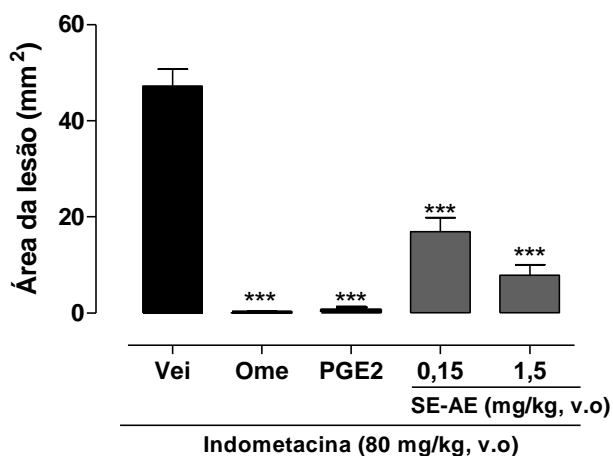


FIGURA 16: Efeito da administração oral da fração SE-AE sobre as lesões gástricas induzidas por indometacina (80 mg/kg, v.o). Os animais foram tratados com veículo (Vei: 0,1 mL/100g), omeprazol (Ome: 40 mg/kg), PGE_2 (20 $\mu\text{g/kg}$, s.c) ou a fração SE-AE (0,15 e 1,5 mg/kg). Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. ($n = 6 - 8$). *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo ulcerado tratado com veículo (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

4.3.6 Efeito da fração SE-AE sobre os níveis de muco aderido na mucosa gástrica após a lesão induzida por etanol ou por indometacina.

A administração de etanol reduziu os níveis de muco aderido na mucosa gástrica de animais tratados com veículo em 65%, quando comparados à mucosa de animais Naive ($1201 \pm 86,4 \mu\text{g}$ de Alcian Blue/g de tecido) (fig 18A). Contudo, os tratamentos pela via oral com a fração SE-AE (0,15 mg/kg) ou com omeprazol (40 mg/kg) (fig 18A) preservaram o conteúdo de muco aderido na mucosa gástrica dos animais ulcerados com etanol.

Similarmente, a administração oral de indometacina (80 mg/kg) também depletou os níveis de muco aderido na mucosa gástrica de animais tratados com veículo em 75% quando comparado ao grupo Naive ($1126 \pm 191,2 \mu\text{g}$ de Alcian Blue/g de tecido) (fig 17B). Da mesma forma, o pré-tratamento com omeprazol (40 mg/kg, v.o.), PGE_2 (20 $\mu\text{g/kg}$, s.c) ou com a fração SE-AE (1,5 mg/kg, v.o.) preservou os níveis de muco aderido na mucosa gástrica para níveis semelhantes aos basais (fig 17B).

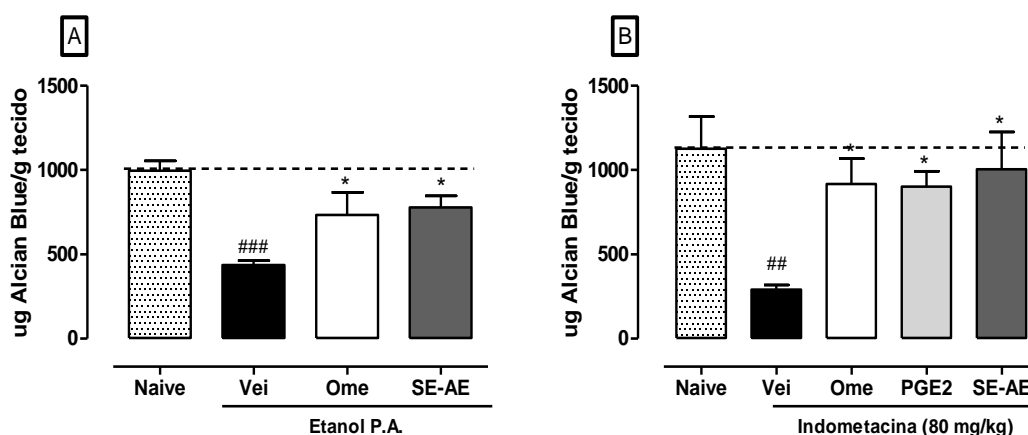


Figura 17: Efeito da administração oral da fração SE-AE sobre os níveis de muco gástrico após lesões gástricas induzidas por etanol ou indometacina (80 mg/kg, v.o). No painel A, os animais receberam etanol e foram tratados com veículo (Vei: 0,1mL/100g), omeprazol (Ome: 40 mg/kg) ou SE-AE (0,15 mg/kg). No painel B, os animais receberam indometacina (80 mg/kg) e foram tratados com veículo (Vei: 0,1mL/100g), omeprazol (Ome: 40 mg/kg), PGE_2 (20 $\mu\text{g/kg}$) ou SE-AE (1,5 mg/kg). Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. (n = 6 - 8). ###P<0,001, quando comparado ao grupo não ulcerado. *P<0,05 quando comparado ao grupo ulcerado tratado com veículo. (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

4.3.7 Efeito da fração SE-AE sobre os níveis de GSH gástrico após a lesão induzida por etanol ou por indometacina.

A exposição da mucosa gástrica ao etanol absoluto depletou os níveis de GSH da mucosa gástrica em 49% comparado com o grupo Naive ($347 \pm 25,1 \mu\text{g}$ de GSH/g de tecido) (fig 18A). Por outro lado, o pré-tratamento oral com omeprazol (40 mg/kg) ou com a fração SE-AE (0,15 mg/kg) (fig 18A), preveniu a depleção da GSH na mucosa gástrica dos animais ulcerados com etanol.

De forma mais intensa que o etanol, a administração de indometacina (80 mg/kg, v.o) depletou o conteúdo de GSH em 85% comparado com o grupo Naive ($341 \pm 26,2 \mu\text{g}$ de GSH/g de tecido) (fig 19B). O tratamento com omeprazol (40 mg/kg, v.o.) ou com a fração SE-AE (1,5 mg/kg), mas não com PGE_2 (20 $\mu\text{g/kg}$), preveniu parcialmente a depleção da GSH na mucosa gástrica em 24% e 28%, respectivamente, em animais ulcerados com indometacina (Fig. 18B).

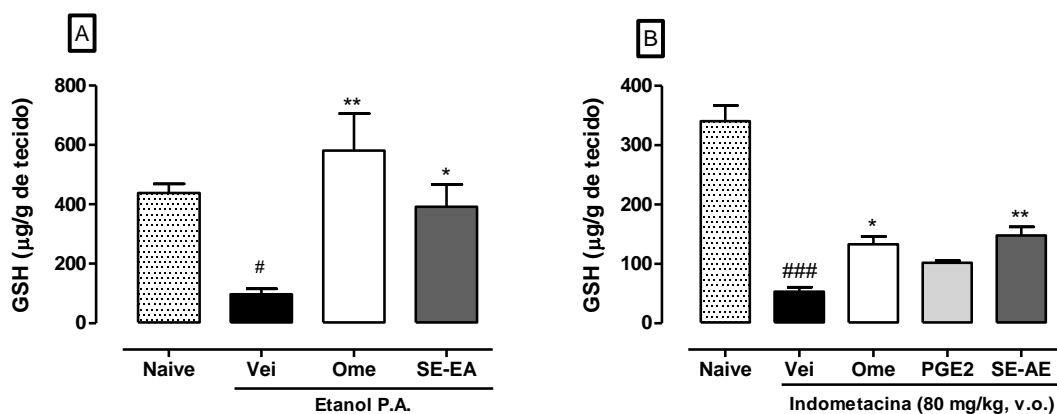


FIGURA 18: Efeito da administração oral da fração SE-AE sobre os níveis de GSH após lesões gástricas induzidas por etanol ou indometacina (80 mg/kg, v.o). No painel A, animais foram tratados com veículo (Vei: 0,1mL/100g), omeprazol (Ome: 40 mg/kg) ou SE-AE (0,15 mg/kg). No painel B, animais foram tratados veículo (Vei: 0,1mL/100g), omeprazol (Ome: 40 mg/kg), PGE_2 (20 $\mu\text{g/kg}$) ou SE-AE (1,5 mg/kg). Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. (n = 6 - 8). #p<0,05 e ###p<0,001, quando comparado ao grupo não ulcerado. *p

<0,05 e **p <0,01, quando comparado ao grupo ulcerado tratado com veículo. (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

4.4 ATIVIDADE CICATRIZANTE GÁSTRICA

4.4.1 Efeito da fração SE-AE sobre úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético em ratas.

A administração oral, duas vezes ao dia, durante sete dias, de omeprazol (20 mg/kg) e de SE-AE (1 e 10 mg/kg) reduziu a área da úlcera gástrica induzida por ácido acético em 67%, 50% , 32%, respectivamente, quando comparado ao grupo ulcerado tratado com veículo (Vei: $117 \pm 7,6 \text{ mm}^2$) (Fig. 19).

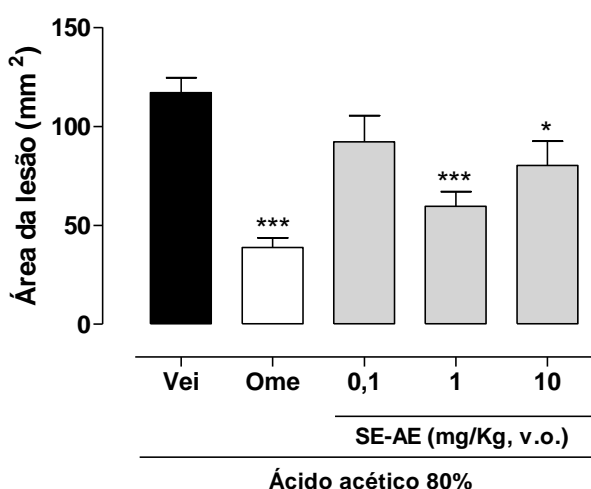


FIGURA 19: Efeito da administração oral da fração SE-AE sobre as lesões gástricas induzidas por ácido acético. Os animais foram tratados com veículo (Vei: 0,1mL/100g), omeprazol (Ome: 20 mg/kg) ou a fração SE-AE (0,1 - 1 mg/kg) duas vezes ao dia, durante sete dias. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. (n = 10). * p <0,05 e *** p <0,001, quando comparado ao grupo ulcerado tratado com veículo. (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

Em conjunto com os dados macroscópicos, a avaliação histológica das lesões gástricas induzidas por ácido acético demonstrou que os animais tratados com omeprazol (20 mg/kg, v.o.) e com a fração SE-AE (1 mg/kg, v.o.) apresentaram cicatrização da úlcera em estado mais avançado (Fig. 20D e 20F) comparado com o grupo ulcerado tratado apenas com o veículo (Fig. 20B).

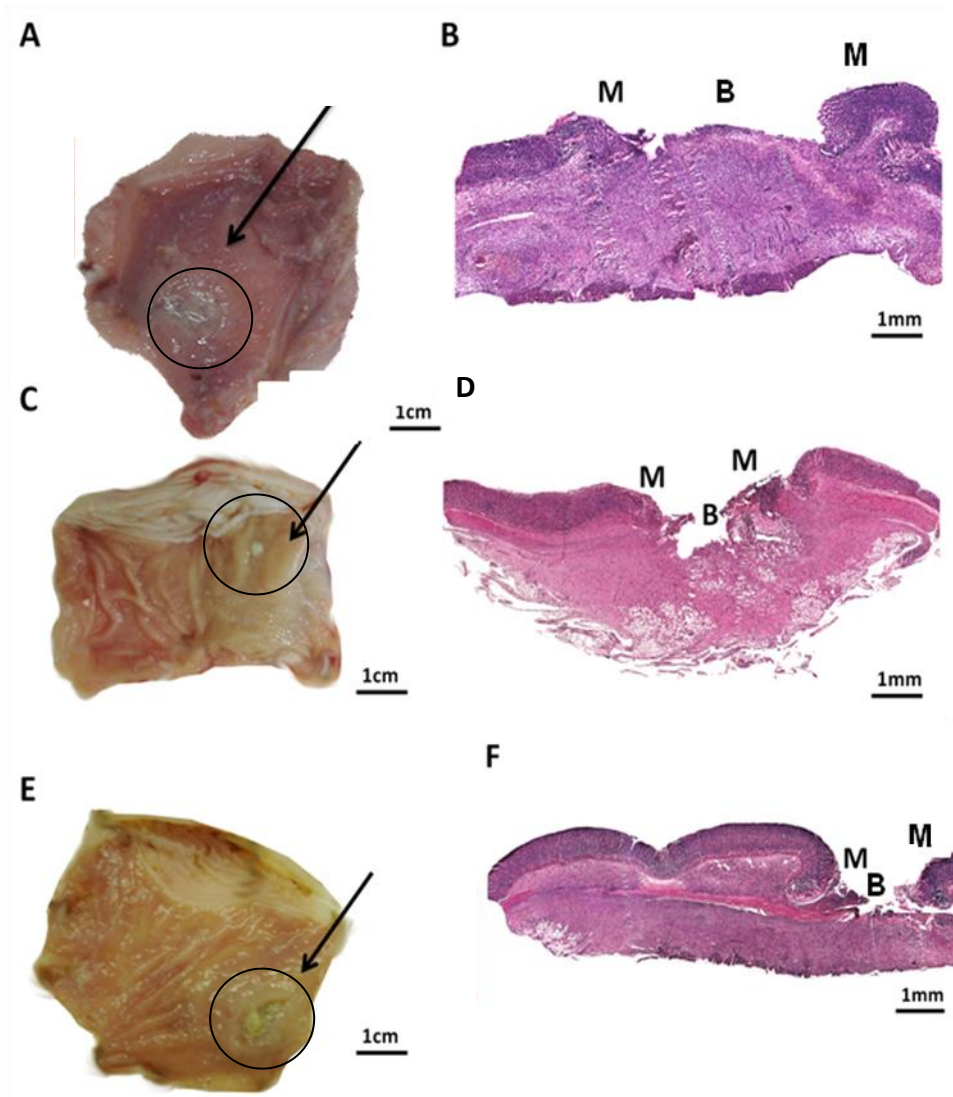


FIGURA 20: Análise macroscópica (Painéis A, C, E) e microscópica (B, D,F) das úlceras crônicas gástricas induzida por ácido acético em ratas. Ratas foram oralmente tratadas com veículo (0,1mL/100g; painel A e B), omeprazol (20 mg/kg; painel C e D) e fração SE-AE (1 mg/kg; painel E e F). Setas e círculos indicam o sítio da lesão. M: margem da úlcera e B: base da úlcera (Aumento de 200X).

4.4.2 Efeito da fração SE-AE sobre os níveis de mucina após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético.

Os resultados apresentados na Fig. 21A mostram que a aplicação de ácido acético 80% na mucosa gástrica promove a diminuição dos níveis de mucinas (glicoproteínas). Por outro lado, a administração oral de omeprazol (20 mg/kg) ou da fração SE-AE (1 mg/kg) aumentaram a marcação para mucina em 106 e 218%, respectivamente (Fig. 21B e C, respectivamente), quando comparado com o grupo ulcerado tratado com veículo (Vei: $1,7 \pm 0,4$ pixels/campo).

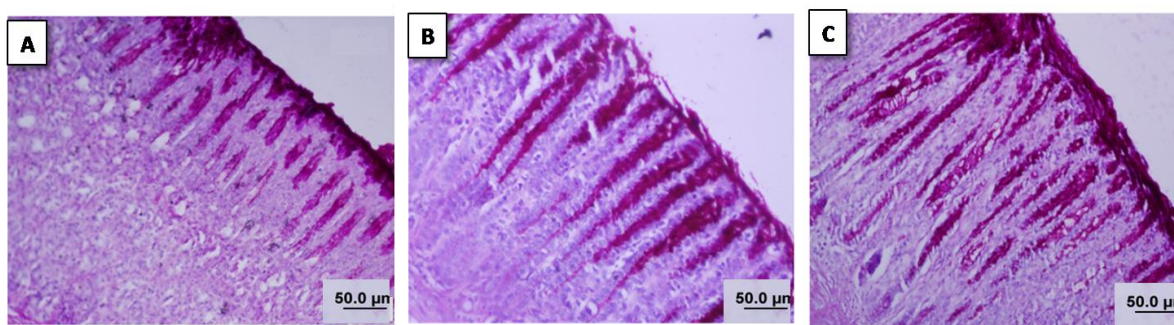


FIGURA 21: Avaliação dos níveis de mucina pelo método histoquímico de PAS das úlceras crônicas induzida por ácido acético 80% em ratas. Os animais foram tratados pela via oral com veículo (0,1 ml/100 g A), omeprazol (20 mg/kg; B) ou fração SE-AE (1 mg/kg; C) durante 7 dias, a partir do 2º dia após a indução da lesão gástrica. Imagens representativas da margem da úlcera (aumento de 400x, escala: 50 µm).

4.4.3 Efeito da fração SE-AE sobre os níveis de atividade da MPO após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético

Os valores da atividade da enzima MPO, uma medida indireta do processo inflamatório, foram aumentados em 345% na mucosa gástrica exposta ao ácido acético quando comparado com os estômagos não ulcerados (Naive: $0,2 \pm 0,04$ m O.D./mg de proteína). O tratamento oral, duas vezes ao dia, com a fração SE-AE (1 mg/kg) ou com omeprazol (20 mg/kg) restabeleceu a atividade da MPO para níveis semelhantes aos basais (Fig. 22A). Similarmente, quando a fração SE-AE nas concentrações de 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$ foi incubada diretamente com o homogenato da úlcera, a atividade da MPO também foi diminuída em 77% e 90%, respectivamente, quando comprado com o homogenato incubado com veículo (Vei: $1,6 \pm 0,25$ m D.O./mg de proteína) (Fig. 22B).

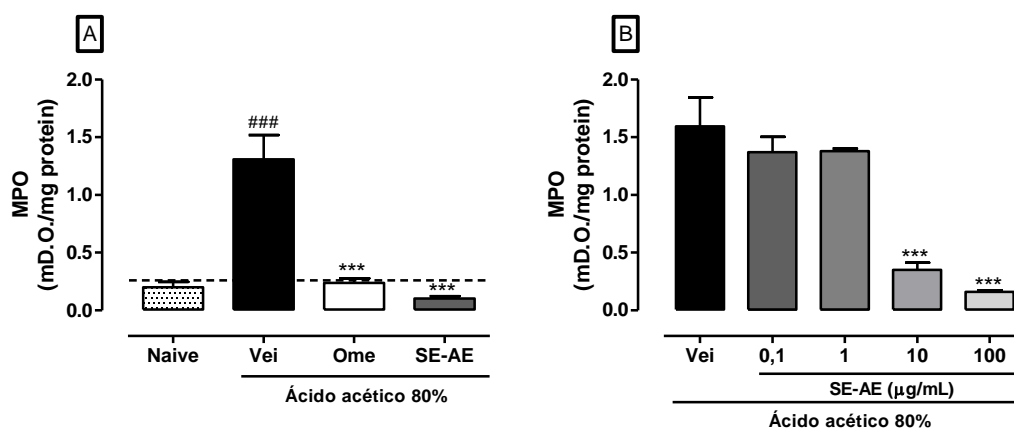


FIGURA 22: Efeito da fração SE-AE sobre a atividade da MPO. No painel A, os animais foram tratados com veículo (Vei: 0.1mL/100g), omeprazol (Ome: 20 mg/kg) ou a fração SE-AE (1 mg/kg) duas vezes ao dia, durante sete dias. No painel B, o homogenato proveniente de um animal ulcerado tratado com veículo foi incubado com veículo ou a fração SE-AE (0,1-100 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. (n = 6). ### p <0,001 quando comparado ao grupo não ulcerado e *** p <0,001, quando comparado ao grupo ulcerado tratado ou incubado com veículo. (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

4.4.4 Efeito da fração SE-AE sobre os níveis de ROS e GSH após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético.

No modelo de úlcera gástrica crônica, o ácido acético aumentou a quantidade de ROS em 52% e diminuiu os níveis de GSH em 57%, quando comparado com o grupo Naive ($24 \pm 1,3$ de fluorescência; $638 \pm 31,2$ μg de GSH/g de tecido, respectivamente) (Fig. 24 A e B, respectivamente). O tratamento oral com a fração SE-AE (1 mg/kg) reduziu os níveis de ROS na mucosa gástrica exposta ao ácido acético para $18 \pm 2,3$ de fluorescência quando comparado ao grupo ulcerado tratado com veículo (Fig. 23A). Além disso, nesta mesma dose a fração SE-AE também restaurou os níveis de GSH para $543 \pm 55,7$ μg de GSH/g de tecido quando comparado com o grupo ulcerado tratado apenas com veículo (Fig. 23B).

O omeprazol (20 mg/kg, v.o.), controle positivo do teste, também reduziu os níveis de ROS para $20 \pm 0,9$ de fluorescência e restaurou o conteúdo de GSH para $362 \pm 52,8$ μg de GSH/g de tecido, quando comparado ao grupo ulcerado tratado apenas com veículo (Fig. 23A e B, respectivamente).

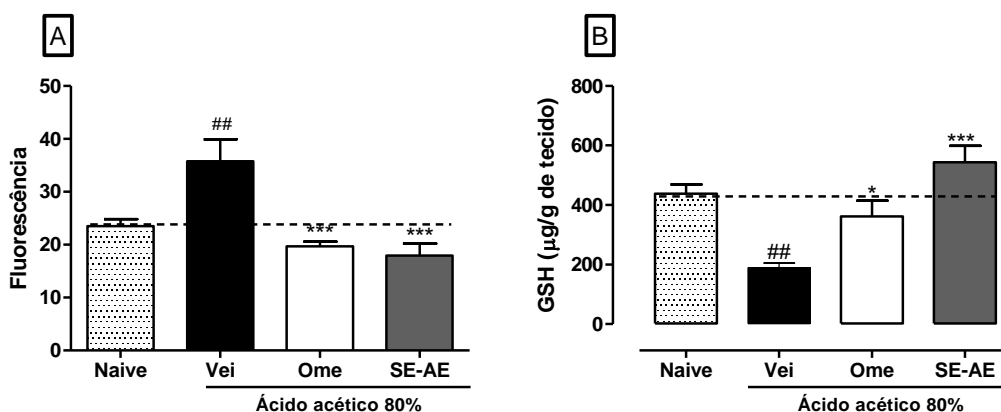


FIGURA 23: Efeito da administração oral da fração SE-AE sobre os níveis de GSH (Painel A) e ROS (Painel B). Os animais foram tratados com veículo (Vei: 0,1mL/100g), omeprazol (Ome: 20 mg/kg) ou a fração SE-AE (0,1 - 1 mg/kg) duas vezes ao dia, durante sete dias. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. (n = 6). ## p < 0,01 quando comparado ao

grupo não ulcerado e * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$, quando comparado ao grupo ulcerado tratado com veículo. (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

4.5 ATIVIDADE ANTISECRETORA.

4.5.1 Efeito da fração SE-AE na secreção ácida gástrica basal e na atividade péptica.

Como indicado na tabela 1, a administração da fração SE-AE (0,15; 1 e 10 mg/kg), pela via oral, intraduodenal ou intraperitoneal não alterou o volume, a acidez total da secreção gástrica e nem a atividade péptica secretada durante 4 h, quando comparados com o grupo veículo ($9 \pm 1,5$ mL; $0,075 \pm 0,006$ mEq[H⁺]/mL e $347 \pm 36,8$ mmol de tirosina/mL, respectivamente). Como esperado, o controle positivo do teste, omeprazol (40 mg/kg, v.o.), diminuiu o volume, a acidez total e a atividade péptica da secreção gástrica em 55%, 70% e 68% respectivamente.

TABELA 1: Efeito da fração SE-AE na secreção ácida gástrica basal e na atividade péptica.

	Volume (mL)	Acidez (mEq[H⁺]/mL)	Atividade péptica (mmol de tirosina/mL)
Veículo (0,1mL/100g, v.o)	9 ± 1,5	0,075 ± 0,006	347 ± 36,8
Omeprazol (20 mg/kg, v.o)	4 ± 0,5*	0,022 ± 0,002 **	114 ± 24,9 **
SE-AE (0,15 mg/kg, v.o)	10 ± 1,4	0,080 ± 0,020	325 ± 46,5
SE-AE (1 mg/kg, v.o)	8 ± 1,0	0,080 ± 0,008	377 ± 25,7
SE-AE (10 mg/kg, v.o)	6 ± 0,7	0,070 ± 0,013	320 ± 36,8
SE-AE (0,15 mg/kg, i.d)	7 ± 1,5	0,090 ± 0,010	450 ± 16,1
SE-AE (1 mg/kg, i.d)	8 ± 1,0	0,070 ± 0,008	380 ± 20,2
SE-AE (10 mg/kg, i.d)	8 ± 0,9	0,070 ± 0,013	410 ± 30,6
SE-AE (0,15 mg/kg, i.p)	6 ± 0,5	0,070 ± 0,011	320 ± 28,3
SE-AE (1 mg/kg, i.p)	7 ± 1,3	0,080 ± 0,009	340 ± 28,1
SE-AE (10 mg/kg, i.p)	6 ± 1,5	0,09 ± 0,012	400 ± 40,1

Resultados foram expressos como média ± E.P.M. (n = 6). * p <0,05 e ** p <0,01 quando comparado ao grupo tratado com veículo. (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

4.5.2 Efeito da fração SE-AE nos níveis séricos de gastrina

Dando continuidade na avaliação de parâmetros envolvidos na secreção gástrica, em animais não ulcerados a administração de omeprazol (20mg/kg), duas vezes ao dia, durante sete dias, aumentou os níveis de gastrina sérica em 167% quando comparado com os animais

não ulcerados tratados com veículo (Vei: $99,2 \pm 31,4$ pg/mL). Contudo, a administração da fração SE-AE (1 mg/kg), duas vezes ao dia, durante sete dias, não alterou os níveis de gastrina sérica em relação aos animais não ulcerados tratados com veículo.

Uma vez que a gastrina também está envolvida na cicatrização da mucosa gástrica, os níveis séricos desse hormônio também foram quantificados em animais ulcerados por ácido acético. A exposição da mucosa gástrica ao ácido acético aumentou os níveis séricos de gastrina nos animais tratados com veículo, omeprazol (20 mg/kg) ou a fração SE-AE (1mg/kg) em 175%, 179% e 342%, respectivamente, quando comparado com os animais não ulcerados tratados com veículo (Vei: $99,2 \pm 31,4$ pg/mL) (Fig. 24A). De forma interessante, animais expostos ao ácido acético e tratados com a fração SE-AE apresentaram níveis séricos de gastrina aumentados em 64% quando comparados com o grupo ulcerado tratado com veículo (Vei: $272 \pm 28,7$ pg/mL) (Fig. 24B).

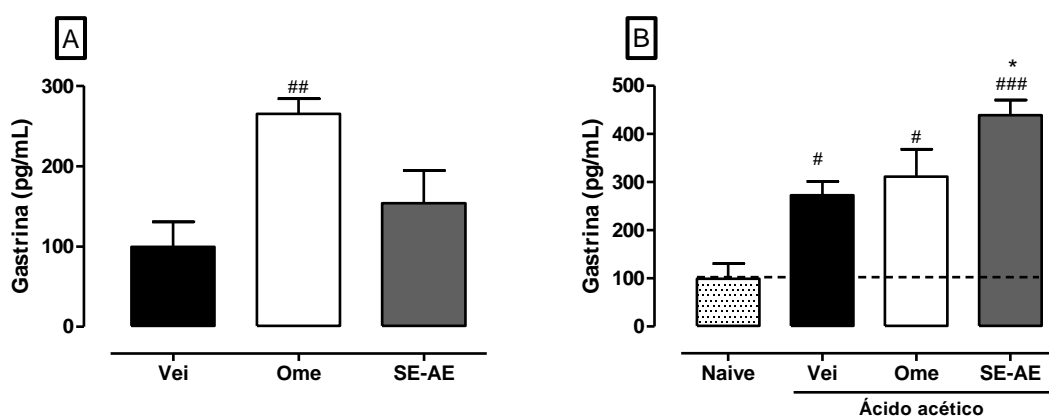


FIGURA 24: Efeito da administração oral da fração SE-AE sobre os níveis séricos de gastrina em ratas não ulceradas (Painel A) e ulceradas (Painel B). Animais foram tratados com veículo (Vei: 0.1mL/100g), omeprazol (Ome: 20 mg/kg) ou a fração SE-AE (1 mg/kg) duas vezes ao dia, durante sete dias. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. (n = 5-6). ### p < 0,001, ## p < 0,01 e # p < 0,05 quando comparado ao grupo não ulcerado tratado com veículo e *p < 0,05 quando comparado ao grupo ulcerado tratado com veículo. (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni)

4.5.3 Efeito *in vitro* da fração SE-AE na atividade da H^+/K^+ -ATPase

Neste experimento, a porcentagem de inibição da atividade da enzima H^+,K^+ -ATPase foi avaliada considerando o grupo veículo (controle) como 100% de atividade. O omeprazol (345 $\mu\text{g/ml}$) inibiu a atividade da enzima em 79%, entretanto a fração SE-AE (10-1000 $\mu\text{g/ml}$), não inibiu a atividade da enzima em nenhuma das concentrações testadas (Tabela 2).

TABELA 2: Efeito *in vitro* da fração SE-AE na atividade da H^+/K^+ -ATPase

	Atividade da H^+/K^+ -ATPase ($\mu\text{M Pi/mg/min}$)
Veículo	0,56 \pm 0,03
Omeprazol (345 $\mu\text{g/mL}$)	0,12 \pm 0,01 ***
Ouabaína	0,47 \pm 0,04
SE-AE (10 $\mu\text{g/mL}$)	0,71 \pm 0,03
SE-AE (100 $\mu\text{g/mL}$)	0,58 \pm 0,01
SE-AE (1000 $\mu\text{g/mL}$)	0,54 \pm 0,05

Resultados foram expressos como média \pm E.P.M. (n = 4). *** p < 0,001 quando comparado ao grupo veículo. (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

4.6 ATIVIDADE SEQÜESTRADORA DE RADICAIS LIVRES (DPPH) E ATIVIDADE INIBITÓRIA DA FORMAÇÃO NÃO ENZIMÁTICA DE PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (AGE) DA FRAÇÃO SE-AE *in vitro*.

A capacidade antioxidante *in vitro* da fração SE-AE foi observada através do ensaio da redução do radical DPPH. Neste experimento, a fração SE-AE (10 e 100 µg/mL) foi capaz de reduzir os níveis do radical livre no meio reacional em, 73% e 92%, respectivamente, quando comparado com veículo (Vei: 45,7 ± 0,62 µM) (Fig. 25A). O controle positivo para este parâmetro foi o ácido ascórbico, que foi capaz de reduzir o conteúdo de DPPH em 71%.

Como alguns ácidos dicafeoilquínicos já foram descritos como agentes anti-glicação, a atividade inibitória da formação não enzimática de AGEs da fração SE-AE também foi realizada através da mensuração da fluorescência emitida pela albumina glicada no meio reacional. Neste ensaio, a incubação da fração SE-AE (1, 10 e 100 µg/mL) foi capaz de reduzir em 38%, 40 % e 84% os níveis de fluorescência emitida (Vei: 13 ± 0,71 de fluorescência). A incubação do meio reacional com ácido ascórbico (1, 10 e 100 µg/mL) não alterou os níveis de fluorescência emitica. Como esperado, a incubação do meio reacional com aminoguanidina 10 µM reduziu em 92% a emissão de fluorescência (Fig. 25B).

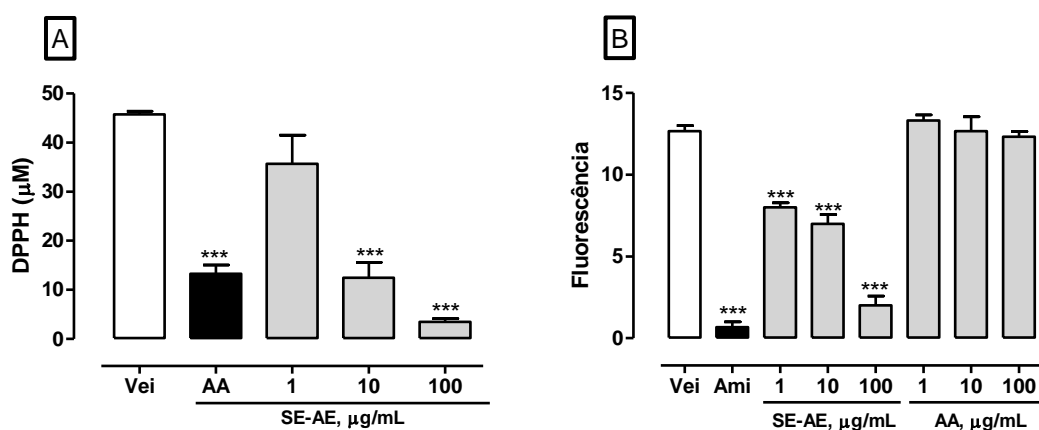


FIGURA 25: Atividade seqüestradora de radicais livres (Painel A) e atividade inibitória da formação não enzimática de AGEs (Painel B) da fração SE-AE *in vitro*. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. (n = 3). *p < 0,05 e ***p < 0,001 quando comparado ao grupo incubado com veículo. (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni)

4.7 ATIVIDADE CICATRIZANTE GÁSTRICA EM ANIMAIS DIABÉTICOS

4.7.1 Efeito da fração SE-AE sobre úlceras gástricas induzidas por ácido acético em ratas diabéticas.

Primeiramente realizamos uma avaliação temporal da extensão das lesões gástricas induzidas por ácido acético em ratas diabéticas. Como indicado na figura 26, verificamos que a extensão das lesões nos animais diabéticos no 9º e no 13º dia após a indução da úlcera por ácido acético foi 48% e 160% maior, respectivamente, quando comparado ao grupo ulcerado normoglicêmico (108 ± 11,5 mm² e 34 ± 8,9 mm², respectivamente).

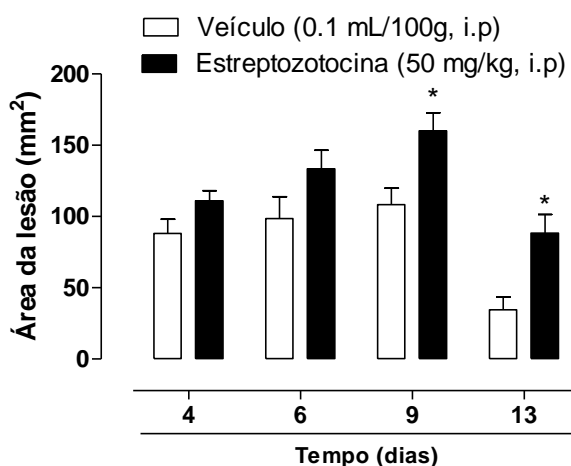


FIGURA 26: Avaliação temporal da extensão das lesões gástricas induzidas por ácido acético em ratas diabéticas. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. (n = 4-6). *p < 0,05 quando comparado ao grupo ulcerado normoglicêmico do mesmo dia. (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

Como demonstrado na figura 27, a área da úlcera gástrica induzida por ácido acético em animais diabéticos tratados com veículo foi 68% maior quando comparado aos animais normoglicêmicos tratados com veículo (Vei: 106 ± 9,4 mm²). A administração de insulina (6 UI/dia, s.c), omeprazol (20 mg/kg, v.o) e da fração SE-AE (10 mg/kg, v.o), duas vezes ao dia, durante sete dias, reduziu a área da úlcera gástrica induzida por ácido acético em ratas

diabéticas em 38, 56 e 70% respectivamente, quando comparado ao grupo diabético ulcerado tratado apenas veículo (Vei: $177 \pm 17,2 \text{ mm}^2$). Por outro lado, o tratamento com ácido ascórbico (300 mg/kg,v.o) e a fração SE-AE (1 mg/kg) não foram capazes de reduzir o tamanho da úlcera quando comparados ao grupo diabético ulcerado tratado apenas veículo (Fig. 27).

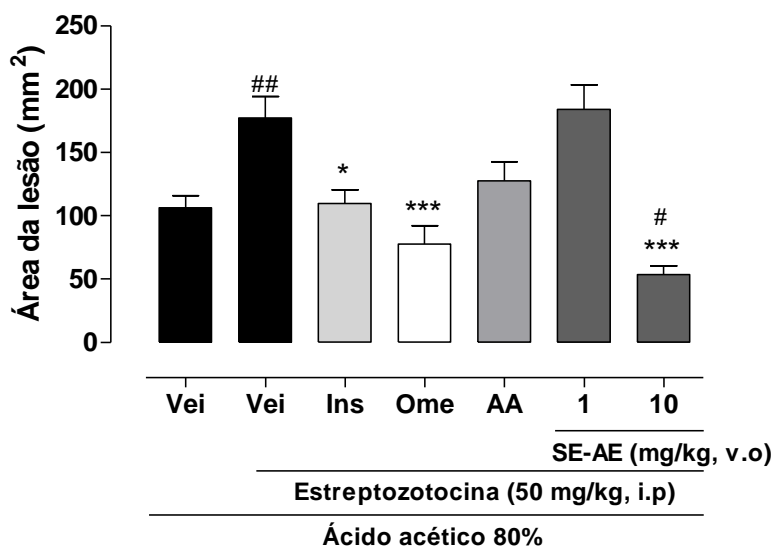


FIGURA 27: Efeito da administração oral da fração SE-AE sobre as úlceras crônicas induzidas por ácido acético 80% em ratas diabéticas. Animais normoglicêmicos foram tratados com veículo (Vei: 0,1mL/100g) ou diabéticos foram tratados com veículo (Vei: 0,1mL/100g), omeprazol (Ome: 20 mg/kg), insulina (6 UI/dia), ácido ascórbico (300 mg/kg) ou a fração SE-AE (1 e 10 mg/kg) duas vezes ao dia, durante sete dias. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. (n = 6-12). ## p < 0,01 quando comparado ao grupo ulcerado normoglicêmico tratado com veículo e * p < 0,05 e *** p < 0,001, quando comparado ao grupo ulcerado diabético tratado com veículo. (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

A análise histotógica das lesões também confirmaram os resultados da avaliação microscópica. Assim, a avaliação histológica das lesões gástricas induzidas por ácido acético demonstrou que ratas diabéticas tratadas com veículo apresentaram um aumento na base da úlcera (Fig 28D) comparado com o grupo ulcerado normoglicêmico tratado com veículo (Fig 28B). Por outro lado, ratas diabéticas tratadas com omeprazol (20 mg/kg, v.o.) ou com a fração SE-AE (10 mg/kg, v.o.) apresentaram cicatrização da úlcera em estado mais avançado

(Fig. 28F e 28H) comparado com o grupo ulcerado diabético tratado apenas com o veículo .

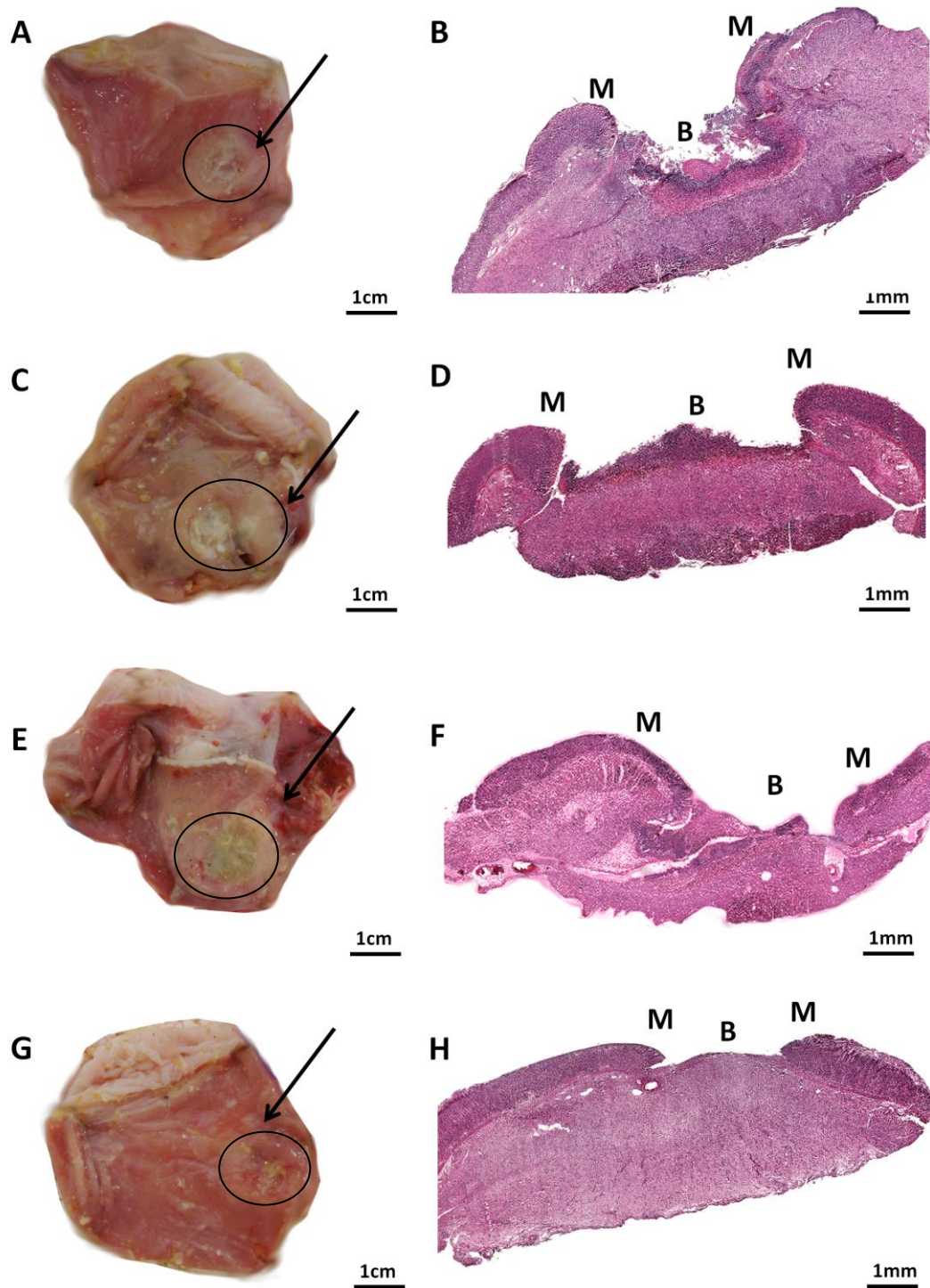


FIGURA 28: Análise macroscópica (Painéis A, C, E e G) e microscópica (B, D,F e H) das úlceras crônicas gástricas induzida por ácido acético em ratas diabéticas. Ratas

normoglicêmicas foram oralmente tratadas com veículo (0,1mL/100g; painel A e B), ratas diabéticas foram oralmente tratadas com veículo (0,1mL/100g; painel C e D), omeprazol (20 mg/kg; painel E e F) e fração SE-AE (10 mg/kg; painel G e H). Setas e círculos indicam o sítio da lesão. M: margem da úlcera e B: base da úlcera (Aumento de 200X).

O peso corpóreo de animais diabéticos tratados oralmente, duas vezes ao dia, durante sete dias com veículo, omeprazol (20 mg/kg), ácido ascórbico (300 mg/kg) e a fração SE-AE (1,0 e 10 mg/kg) foi 17%, 8%, 9% e 5% menor, respectivamente, quando comparado ao peso corpóreo de animais normoglicêmicos tratados com veículo ($226 \text{ g} \pm 5,3$). Como esperado, animais diabéticos tratados diariamente com insulina (6 UI /dia, s.c.) não apresentaram perda de peso quando comparados aos animais normoglicêmicos tratados com veículo (Tabela 3).

Ainda nestes animais diabéticos, a glicemia em jejum após os tratamentos com veículo, insulina (6 UI /dia, s.c.), omeprazol (20 mg/kg, v.o), ácido ascórbico (300 mg/kg, v.o) e a fração SE-AE (10 mg/kg, v.o) foi de $398 \pm 3,7 \text{ mg/dL}$; $108 \pm 8,0 \text{ mg/dL}$; $460 \pm 27,9 \text{ mg/dL}$, $465 \pm 3,8 \text{ mg/dL}$ e $397 \pm 3,7 \text{ mg/dL}$ (Animais normoglicêmicos tratados com veículo: $95 \pm 3,7 \text{ mg/dL}$) (Tabela 3).

Os níveis de hemoglobina glicada dos animais diabéticos tratados com veículo, insulina (6 UI /dia, s.c.), omeprazol (20 mg/kg, v.o), ácido ascórbico (300 mg/kg, v.o) e a fração SE-AE (10 mg/kg, v.o) foi de $10,5 \pm 1,1\%$; $5,3 \pm 0,7 \%$; $12,3 \pm 2,0\%$; $9,7 \pm 1,6\%$ e $7,7 \pm 0,9\%$, respectivamente. (Animais normoglicêmicos tratados com veículo: $2,3 \pm 0,3\%$) (Tabela 3).

TABELA 3: Efeito da administração da fração SE-AE duas vezes ao dia, durante sete dias, no peso corporal, glicemia em jejum e hemoglobina glicada em ratas diabéticas expostas ao ácido acético.

		Peso (g)	Glicemia (mg/dL)	Hemoglobina glicada (%)
Tampão citrato (0,1 mL/kg)	Veículo (0,1 mL/100g)	229 ± 3,9	95 ± 3,7	2,6 ± 0,3
Estreptozotocina (50 mg/kg, i.p)	Veículo (0,1 mL/100g)	176 ± 8,2 [#]	398 ± 40,7 [#]	10,5 ± 1,1 [#]
	Insulina (6 UI/dia)	256 ± 7,4 [*]	108 ± 8,0 [*]	5,3 ± 0,7 [*]
	Omeprazol (20 mg/kg)	185 ± 9,5	460 ± 27,9	12,3 ± 2,0
	Ác. ascórbico (300 mg/kg)	176 ± 7,9	465 ± 3,8	9,7 ± 1,6
	SE-AE (10mg/kg)	204 ± 11,1	397 ± 3,7	7,7 ± 0,9

Resultados foram expressos como média ± E.P.M. (n = 6-12). [#] p <0,001 quando comparado ao grupo ulcerado normoglicêmico tratado com veículo e ^{*} p <0,001 quando comparado ao grupo ulcerado diabético tratado com veículo. (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

4.7.2 Efeito da fração SE-AE sobre os níveis de mucina após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético em ratas diabéticas.

Como esperado, a aplicação de ácido acético 80% na mucosa gástrica de animais normoglicêmicos ou diabéticos promoveu uma diminuição nos níveis de mucinas (Fig. 29A). Contudo, a administração oral de omeprazol (20 mg/kg) ou a fração SE-AE (10 mg/kg) aumentaram a marcação para mucina em 200 e 180%, respectivamente (Fig. 29B e C, respectivamente), quando comparado com o grupo ulcerado diabético tratado com veículo (Vei: 2,8 ± 0,5 pixels/campo × 10⁴) .

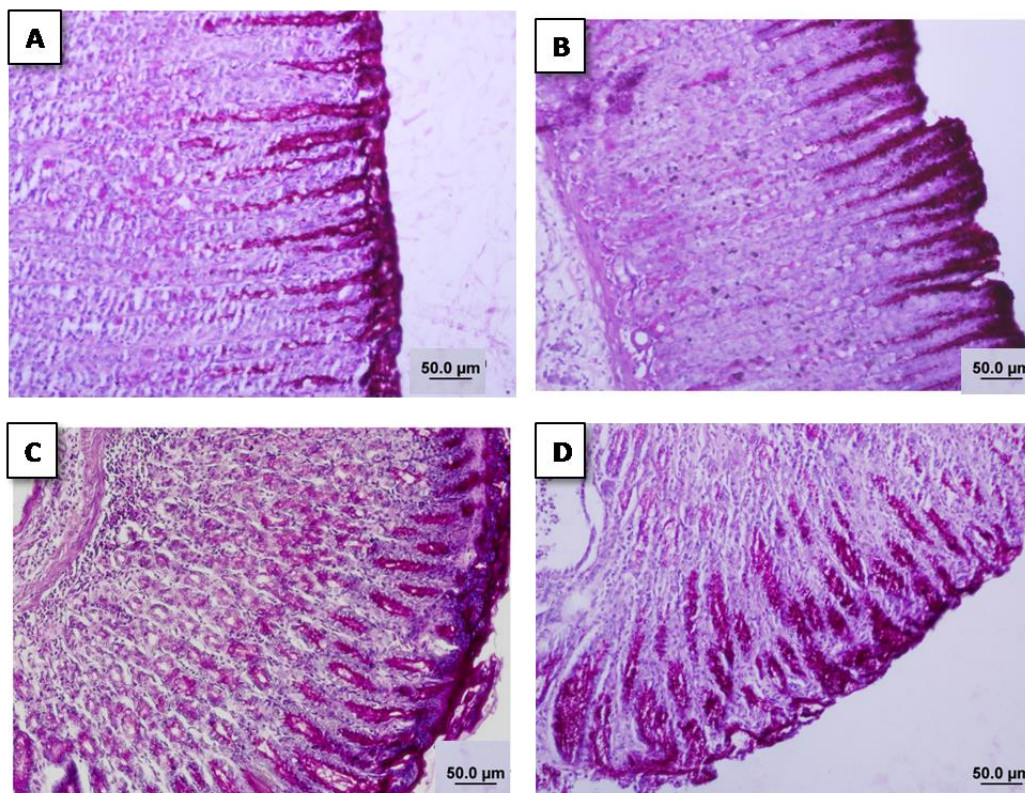


FIGURA 29: Avaliação dos níveis de mucina pelo método histoquímico de PAS das úlceras crônicas induzida por ácido acético 80% em ratas diabéticas. Os animais normoglicêmicos foram tratados pela via oral com veículo (0,1 ml/100 g, A), diabéticos foram tratados pela via oral com veículo (0,1 ml/100 g, B), omeprazol (20 mg/kg; C) ou fração SE-AE (10 mg/kg; D) durante 7 dias, a partir do 2º dia após a indução da lesão gástrica. Imagens representativas da margem da úlcera (aumento de 400x, escala: 50 µm).

4.7.3 Efeito da fração SE-AE sobre os níveis de MPO após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético em ratas diabéticas.

Como demonstrado na figura 22, a exposição ao ácido acético aumentou em 300% e 277% os níveis de atividade da MPO na mucosa gástrica de animais normoglicêmicos e diabéticos, respectivamente, quando comparado aos estômagos não ulcerados (Naive: $0,13 \pm 0,03$ mO.D./mg de proteína). O tratamento oral com a fração SE-AE (10 mg/kg), mas não com omeprazol (20 mg/kg), reduziu significativamente os níveis da atividade da MPO em 64% (Fig. 30).

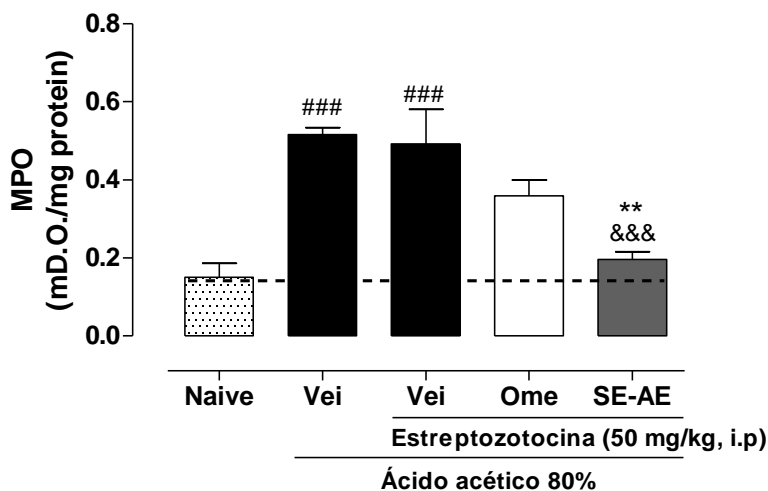


Figura 30: Efeito da administração oral da fração SE-AE sobre a atividade da MPO da mucosa gástrica em ratas diabéticas. Animais normoglicêmicos foram tratados com veículo (Vei: 0.1mL/100g) ou diabéticos foram tratados com veículo 0.5% (Vei: 0.1mL/100g), omeprazol (Ome: 20 mg/kg) ou a fração SE-AE (10 mg/kg) duas vezes ao dia, durante sete dias. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. (n = 6). ### p < 0,001 quando comparado ao grupo não ulcerado, &&& p < 0,001 e *** p < 0,001, quando comparado ao grupo ulcerado normoglicêmico e diabético tratado com veículo, respectivamente. (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

4.7.4 Efeito da fração SE-AE sobre os níveis de ROS e GSH após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético em ratas diabéticas.

A instilação de ácido acético na serosa de ratas normoglicêmicos e diabéticos promoveu o aumento no conteúdo de ROS em 69% e 138%, respectivamente, quando comparados com o grupo Naive ($1,2 \pm 0,4$ de fluorescência). Entretanto, tanto o tratamento com omeprazol (20 mg/kg) ou a fração SE-AE (10 mg/kg) reduziram os níveis de ROS da mucosa gástrica de ratas diabéticas para $37 \pm 4,9$ de fluorescência e $34 \pm 5,1$ de fluorescência quando comparado com os animais diabéticos tratados com veículo (Vei: $55 \pm 3,5$ de fluorescência) (Fig. 31A).

Como previsto, a instilação de ácido acético diminuiu em 55% e 75% os níveis de GSH na mucosa gástrica de animais normoglicêmicos e diabéticos, tratados com veículo, respectivamente, quando comparado aos estômagos do grupo Naive ($422 \pm 46,8 \mu\text{g}$ de GSH/g de tecido). O tratamento oral com omeprazol (20 mg/kg) ou com a fração SE-AE (10 mg/kg) restaurou parcialmente os níveis de GSH para $263 \pm 42,9 \mu\text{g}$ de GSH/g de tecido e $282 \pm 16,1 \mu\text{g}$ de GSH/g de tecido quando comparado com os animais diabéticos tratados com veículo (Vei: $107 \pm 35,2 \mu\text{g}$ de GSH/g de tecido) (Fig. 31B).

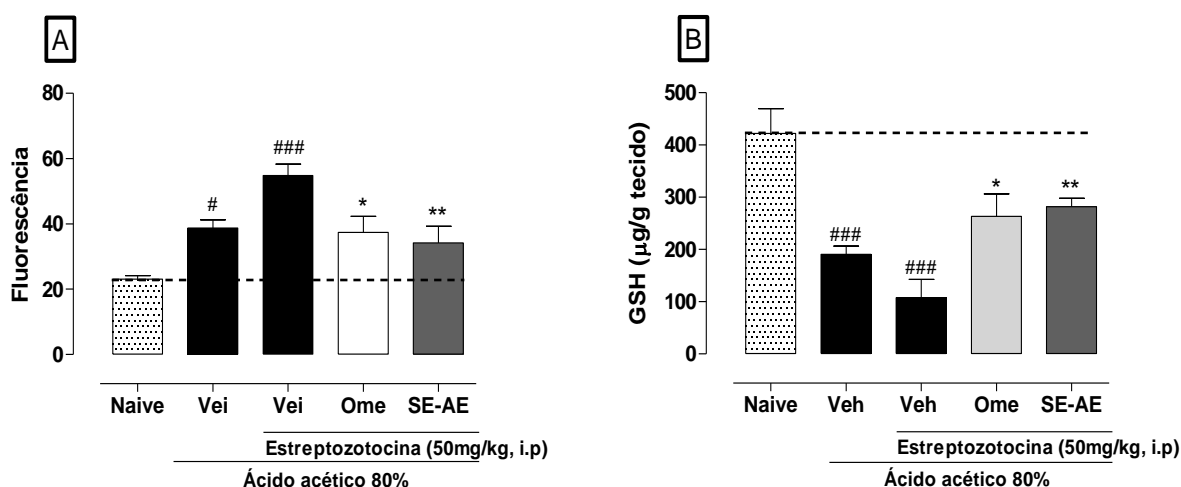


FIGURA 31: Efeito da administração oral da fração SE-AE sobre os níveis de ROS (Painel A) e GSH (Painel B) da mucosa gástrica em ratas diabéticas. Animais normoglicêmicos foram tratados com veículo (Vei: 0,1mL/100g) e animais diabéticos foram tratados com veículo (Vei: 0,1mL/100g), omeprazol (Ome: 20 mg/kg) ou a fração SE-AE (10 mg/kg) duas vezes ao dia, durante sete dias. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. (n = 6). ### p < 0,001, ## p < 0,01 e # p < 0,05 quando comparado ao grupo não ulcerado *p < 0,05 e ** p < 0,01, quando comparado ao grupo diabético ulcerado tratado com veículo. (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

4.7.5 Efeito da fração SE-AE sobre a atividade das enzimas SOD, CAT, GST e GPx após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético em animais diabéticos.

Para mensurar o estresse oxidativo na lesão gástrica induzida por ácido acético em ratas diabéticas, a atividade das enzimas SOD, CAT, GST e GPx foram mensuradas. Como

indicado na tabela 4, após a indução da úlcera com ácido acético, a atividade da enzima SOD na mucosa gástrica de animais normoglicêmicos e diabéticos foi aumentada em 302% e 408% comparada com o grupo não Naive ($13 \pm 0,5$ U/mg de proteína). Similarmente, a indução da úlcera com ácido acético também promoveu o aumento da atividade da CAT na mucosa gástrica de animais normoglicêmicos e diabéticos em 1300 e 2840% quando comparada com o Naive ($0,5 \pm 0,2$ mmol/mg de proteína/min). Contudo, a administração oral de da fração SE-AE (10 mg/kg) restaurou a atividade enzimática da SOD para $47 \pm 4,1$ U/mg de proteína, mas não da CAT, quando comparado com o grupo diabético ulcerado tratado com veículo ($67 \pm 2,4$ U/mg de proteína e $15 \pm 1,2$ mmol/mg de proteína/min). O controle positivo do teste, omeprazol (20 mg/kg, v.o.) restaurou a atividade da SOD para $55 \pm 4,4$ U/mg de proteína e não alterou a atividade da CAT.

A atividade da enzima GST na mucosa gástrica de animais normoglicêmicos e diabéticos submetidos ao ácido acético foi diminuída em 57 e 54%, respectivamente, quando comparada com o grupo Naive ($211 \pm 15,0$ nmol /mg de proteína/min). Por outro lado, os níveis de atividade da enzima GPx foram intensamente aumentados pela exposição ao ácido acético em animais normoglicêmicos e em diabéticos em 369% e 884%, respectivamente, quando comparados com grupo Naive ($6 \pm 0,02$ nmol /mg de proteína/min). Contudo, a administração oral de da fração SE-AE (10 mg/kg) restaurou parcialmente a atividade enzimática tanto da GST quanto da GPx para $138 \pm 7,6$ nmol /mg de proteína/min e $2 \pm 0,07$ nmol /mg de proteína/min, respectivamente, quando comparado ao grupo diabético ulcerado tratado com veículo ($97 \pm 8,8$ nmol /mg de proteína/min e $6 \pm 0,006$ nmol /mg de proteína/min, respectivamente). O controle positivo do teste, omeprazol (20 mg/kg, v.o.) também restaurou parcialmente a atividade da GST e GPx para $141 \pm 7,5$ nmol /mg de proteína/min e $3 \pm 0,06$ nmol /mg de proteína/min, respectivamente (tabela 4).

TABELA 4: Efeito da administração da fração SE-AE duas vezes ao dia, durante sete dias, na atividade das enzimas SOD, CAT, GST e GPx na mucosa gástrica de ratas diabéticas expostas ao ácido acético.

		SOD (U/mg de proteína)	CAT (mmol/mg de proteína)	GST (nmol/mg de proteína)	GPx (mmol/mg de proteína)
Naive		13 ± 0,5	0,5 ± 0,2	211 ± 15,0	0,6 ± 0,02
Tampão citrato (0,1 mL/kg)	Veículo (0,1 mL/100g)	53 ± 1,5 ^{###}	7 ± 0,8 ^{###}	90 ± 3,8 ^{###}	3 ± 0,07 [#]
Estreptozotocina (50 mg/kg, i.p)	Veículo (0,1 mL/100g)	67 ± 2,4 ^{###}	15 ± 1,2 ^{###}	97 ± 8,8 ^{###}	6 ± 0,06 ^{###}
	Omeprazol (20 mg/kg)	55 ± 4,4 [*]	18 ± 1,5	141 ± 7,2 [*]	3 ± 0,07 [*]
	SE-AE (10mg/kg)	47 ± 4,1 ^{***}	16 ± 1,6	138 ± 7,6 [*]	2 ± 0,08 ^{**}

Resultados foram expressos como média ± E.P.M. (n = 6). [#] p <0,001 quando comparado ao grupo ulcerado normoglicêmico tratado com veículo e ^{*} p <0,001, quando comparado ao grupo ulcerado diabético tratado com veículo. (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

4.8 EFEITO NA FUNÇÃO MOTORA GÁSTRICA

4.8.1 Efeito da administração da fração SE-AE sobre o esvaziamento gástrico em ratas diabéticas.

A avaliação temporal da taxa de esvaziamento gástrico em ratas diabéticas revelou que após 2 e 8 semanas da indução do diabetes o esvaziamento gástrico foi diminuído em 29% e 35%, quando comparado aos animais tratados com veículo (Vei: 66 ± 6,2% e 65 ± 4,2% de esvaziamento gástrico, respectivamente). Por outro lado, após 4 semanas da indução do diabetes o esvaziamento gástrico foi aumentado em 29%, quando comparado aos animais tratados com veículo (Vei: 65 ± 5,1% de esvaziamento gástrico) (Fig 32).

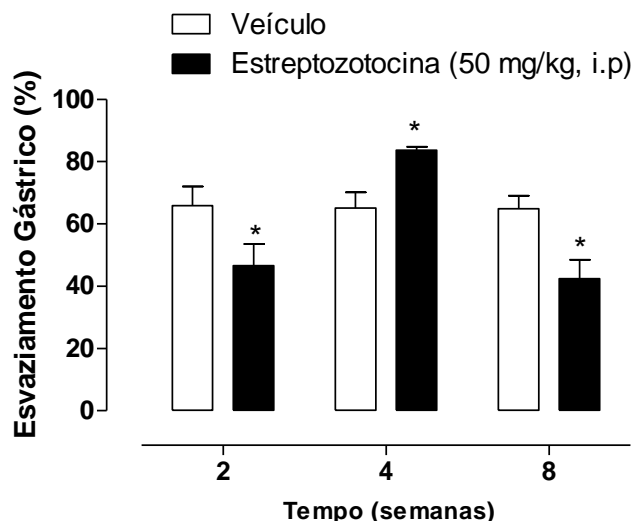


FIGURA 32: Avaliação temporal do esvaziamento gástrico em ratas diabéticas. Os animais normoglicêmicos (Veículo: tampão citrato 0.01 M, pH 4.5 0.1 mL/100g, i.p) ou diabéticos (STZ: estreptozotocina 50 mg/kg, i.p) foram tratados com água+ Tween® 0,5% (0,1mL/100g). Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. (n = 6-8). *p < 0.05 quando comparado ao grupo normoglicêmico da mesma semana. (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

A taxa de esvaziamento gástrico dos animais diabéticos tratados com veículo foi 38% menor em relação aos animais normoglicêmicos tratados com veículo (Vei: $68 \pm 3,4\%$ de esvaziamento gástrico). O tratamento oral com domperidona (20 mg/kg), ácido ascórbico (300 mg/kg) e a fração SE-AE (1; 3 e 10 mg/kg), uma vez ao dia, durante 6 semanas, a partir da segunda semana após a indução do diabetes, aumentou a taxa de esvaziamento gástrico em ratas diabéticas para $89 \pm 2,0\%$, $76 \pm 3,8\%$, $82 \pm 2,8\%$, $78 \pm 1,3\%$ e $78 \pm 1,8\%$ de esvaziamento gástrico. Da mesma forma, a administração diária de insulina (6 UI/dia, s.c), a partir do terceiro dia da indução do diabetes, também restaurou a taxa de esvaziamento gástrico em ratas diabéticas para $70 \pm 3,2\%$ de esvaziamento gástrico (Fig. 33).

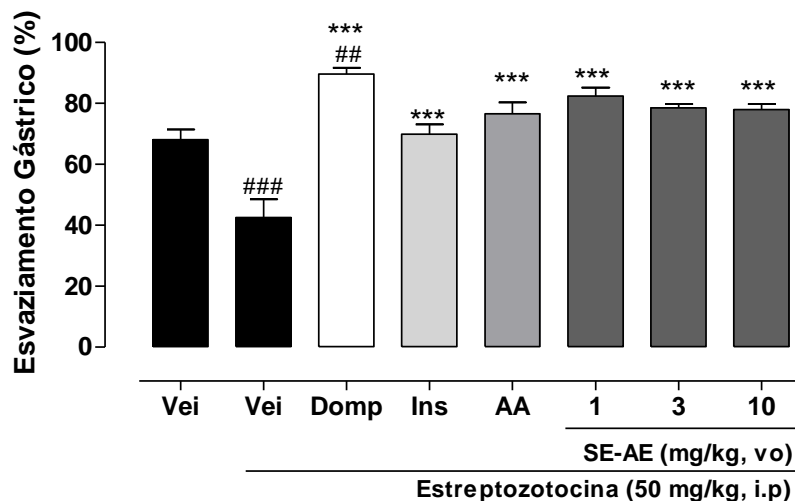


FIGURA 33: Efeito da fração SE-AE sobre o esvaziamento gástrico em ratas diabéticas. Os animais normoglicêmicos foram tratados com veículo (Vei: 0.1mL/100g) e diabéticos foram tratados com veículo (Vei: (0.1mL/100g), domperidona (Domp: 20 mg/kg), insulina (Ins.: 6UI/dia), ácido ascórbico (AA: 300 mg/kg) ou a fração SE-AE (SE-AE: 1-10 mg/kg). Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. (n = 6). ##p<0.01 e ###p<0,001 quando comparado ao grupo normoglicêmico tratado com veículo e ***p <0,001 quando comparado ao grupo diabético tratado com veículo. (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni)

Ao contrário com o observado no tratamento crônico, o tratamento agudo com a fração SE-AE na dose de 1 mg/kg, pela via oral, não alterou a taxa de esvaziamento gástrico em ratas normoglicêmicas (Fig. 34A) quando comparado aos animais normoglicêmico tratados com veículo (Vei: $67 \pm 3,2\%$ de esvaziamento gástrico). Similarmente, o tratamento agudo oral com a fração SE-AE na dose de 1 mg/kg após 8 semanas da indução do diabetes também não foi capaz de alterar a taxa de esvaziamento gástrico em ratas diabéticas quando comparado ao animais diabéticos tratados com veículo (Vei: $37,6 \pm 8,0\%$ de esvaziamento gástrico) (Fig. 34B). Como esperado a administração de domperidona (Domp: 20mg/kg, v.o) elevou a taxa de esvaziamento para $90 \pm 2,5\%$ e para $82 \pm 2,2\%$ em animais normoglicêmicos e diabéticos, respectivamente, enquanto que a administração de atropina (Atro: 3 mg/kg, s.c) reduziu para $40 \pm 5,9$ (Fig. 34A) a taxa de esvaziamento gástrico de animais normoglicêmicos.

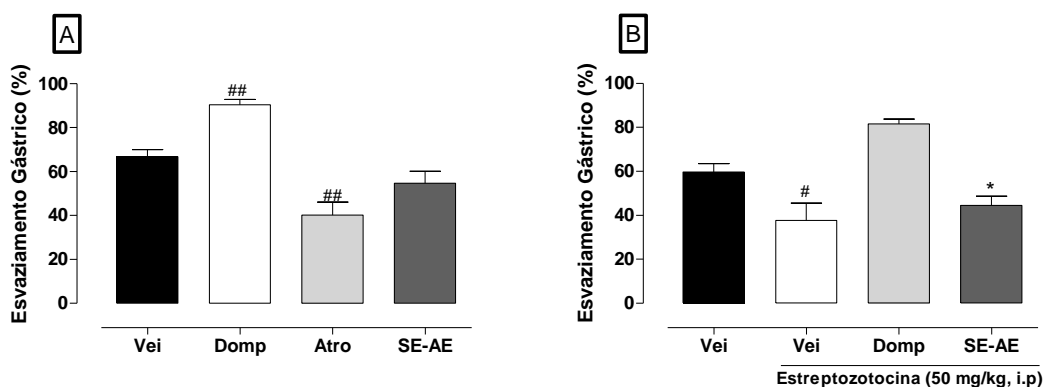


FIGURA 34: Efeito da administração oral aguda da fração SE-AE sobre a taxa de esvaziamento gástrico de ratas normoglicêmicas (Painel A) e diabéticas (Painel B). No painel A, animais foram tratados com veículo (Vei: 0.1mL/100g), domperidona (Domp: 20 mg/kg), atropina (Atro: 3 mg/kg, s.c) ou a fração SE-AE (1 mg/kg). No painel B, animais normoglicêmicos foram tratados com veículo (Vei: 0.1mL/100g) e animais diabéticos foram tratados com veículo (Vei: 0.1mL/100g), domperidona (Domp: 20 mg/kg) ou a fração SE-AE (1 mg/kg). ## p < 0,01 e # p < 0,05 quando comparado ao grupo normoglicêmico tratado com veículo. ** p < 0,01 e * p < 0,05 quando comparado ao grupo tratado com. (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

O peso corpóreo das ratas diabéticas tratados durante seis semanas com veículo, domperidona (20 mg/kg), ácido ascórbico (300 mg/kg, v.o) e a fração SE-AE (1 mg/kg, v.o) foi 62%, 56%, 58% e 69% menor, respectivamente, quando comparado ao peso corpóreo de animais normoglicêmicos tratados com veículo ($263 \text{ g} \pm 11,6$). Como esperado, animais diabéticos tratados diariamente com insulina (6 UI /dia, s.c.) não apresentaram perda de peso quando comparados aos animais normoglicêmicos tratados com veículo (Tabela 5).

A glicemia em jejum dos animais diabéticos tratados com veículo, insulina (6 UI /dia, s.c.), domperidona (20 mg/kg), ácido ascórbico (300 mg/kg, v.o) e a fração SE-AE (1 mg/kg, v.o) foi de $533 \pm 55,8 \text{ mg/dL}$; $104 \pm 18,9 \text{ mg/dL}$; $480 \pm 52,3 \text{ mg/dL}$; $525 \pm 32,5 \text{ mg/dL}$; $476 \pm 37,8 \text{ mg/dL}$. A glicemia em jejum dos animais normoglicêmicos tratados com veículo foi de $99 \pm 2,3 \text{ mg/dL}$ (Tabela 5).

Os níveis de hemoglobina glicada dos animais diabéticos tratados com veículo, insulina (6 UI /dia, s.c.), domperidona (20 mg/kg), ácido ascórbico (300 mg/kg, v.o) e a fração SE-AE (1 mg/kg, v.o) foi de $15 \pm 0,9\%$, $6 \pm 0,9\%$, $12\% \pm 1,2\%$, $14 \pm 0,9\%$ e $9 \pm 0,2\%$, respectivamente. A taxa de hemoglobina glicada dos animais normoglicêmicos tratados com veículo foi de $3 \pm 0,3\%$ (Tabela 5).

TABELA 5: Efeito da administração da fração SE-AE uma vez ao dia, durante seis semanas, no peso corporal, glicemia em jejum e hemoglobina glicada em ratas diabéticas.

		Peso (g)	Glicemia (mg/dL)	Hemoglobina glicada (%)
Tampão citrato (0,1 mL/kg)	Veículo (0,1 mL/100g)	263 ± 11,6	99 ± 2,3	3 ± 0,3
Estreptozotocina (50 mg/kg, i.p)	Veículo (0,1 mL/100g)	163 ± 10,1 ^{###}	533 ± 55,8 ^{###}	15 ± 0,9 ^{###}
	Insulina (6 UI/dia)	237 ± 1,7 ^{**}	104 ± 18,9 ^{***}	6 ± 0,9 ^{***}
	Domperidona (20 mg/kg)	147 ± 31,4	480 ± 52,3	12 ± 1,2
	Ác. ascórbico (300 mg/kg)	152 ± 11,9	525 ± 32,5	14 ± 0,9
	SE-AE (1mg/kg)	182 ± 20,9	476 ± 37,8	9 ± 2,0 [*]

Resultados foram expressos como média ± E.P.M. (n = 6). ^{###} p <0,001 quando comparado ao grupo ulcerado normoglicêmico tratado com veículo e ^{***} p <0,001, ^{**} p <0,001 quando comparado ao grupo ulcerado diabético tratado com veículo. (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni)

4.8.2 Efeito da administração da fração SE-AE sobre as contrações evocadas pelo KCl (40mM) no fundo gástrico e piloro de ratas diabéticas.

Para avaliar o efeito da fração SE-AE sobre a resposta contrátil do fundo gástrico de ratas diabéticas, o agente despolarizante KCl foi utilizado. Como indicado na figura 35, a contração produzida pelo KCl (40mM) no piloro e fundo gástrico de animais normoglicêmicos tratados com veículo foi de 0.3 ± 0.07 g e 0.5 ± 0.12 g de contração, respectivamente, e foi similar (p>0.05) as contrações observadas no piloro e fundo do grupo diabético tratado com veículo ou insulina (Vei: 0.3 ± 0.05 g e 0.8 ± 0.20 g de contração, respectivamente e Ins: 0.2 ± 0.07 g e 0.8 ± 0.14 g de contração, respectivamente). De forma

interessante, o tratamento oral com ácido ascórbico (300 mg/kg) e SE-AE (1 mg/kg) aumentou a contração evocada por KCl (40 mM) no fundo gástrico, mas não no piloro, em 280%, quando comparado aos animais normoglicêmicos tratados com veículo.

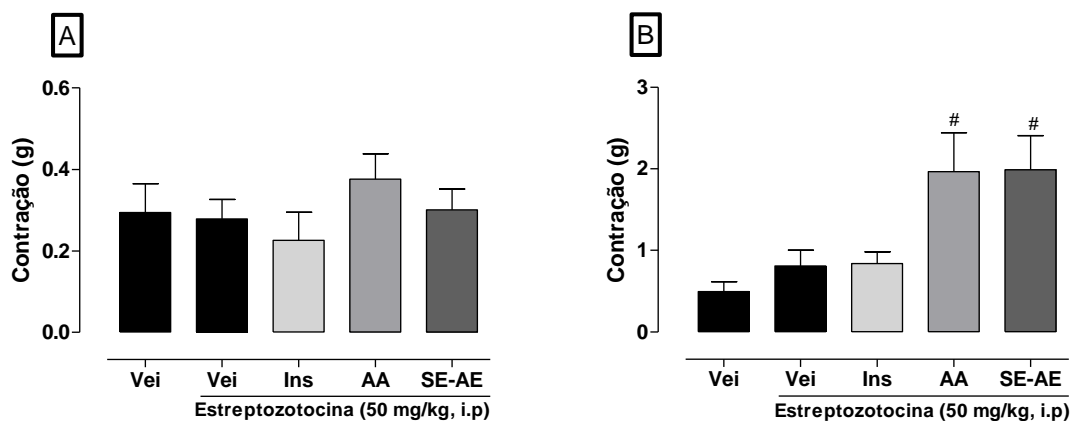


FIGURA 35: Efeito da fração SE-AE sobre a contração evocada por KCl (40 mM) no piloro (Painel A) e fundo gástrico (Painel B) de ratas diabéticas. Os animais normoglicêmicos foram tratados com veículo (Vei.; 0.1mL/100g) e diabéticos foram tratados com veículo (Vei: 0.1mL/100g), insulina (Ins: 6UI/dia), ácido ascórbico (AA: 300 mg/kg) ou a fração SE-AE (1 mg/kg). [#]p<0,05 quando comparado ao grupo normoglicêmico tratado com veículo. (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

4.8.3 Efeito da administração da fração SE-AE sobre as contrações evocadas por acetilcolina (Ach) no fundo gástrico e piloro de ratas diabéticas.

Adicionalmente ao KCl, a resposta contrátil à Ach também foi acessada. Como indicado na figura 36, a resposta contrátil máxima observada na curva concentração-resposta (CCR) à Ach (10^{-10} a 10^{-6} M) do piloro de ratas diabéticas tratadas com veículo foi aumentada em 51% em relação a resposta observada no piloro de animais normoglicêmicos tratados com veículo (E máx.: $0,21 \pm 0,04$ g de contração). Por outro lado, o tratamento com insulina (6UI/dia, figura 36A), ácido ascórbico (300 mg/kg, figura 36B) restaurou a resposta contrátil máxima do piloro de ratas para $0,15 \pm 0,03$ e $0,17 \pm 0,05$ g de contração, respectivamente. O tratamento com a fração SE-AE (1mg/kg) não foi capaz de reduzir a resposta contrátil máxima, porém aumentou para $-6.8 \log [Ach]$ a CE_{50} da Ach (CE_{50} do grupo diabético tratado com veículo: $-8.5 \log [Ach]$) (figura 36C).

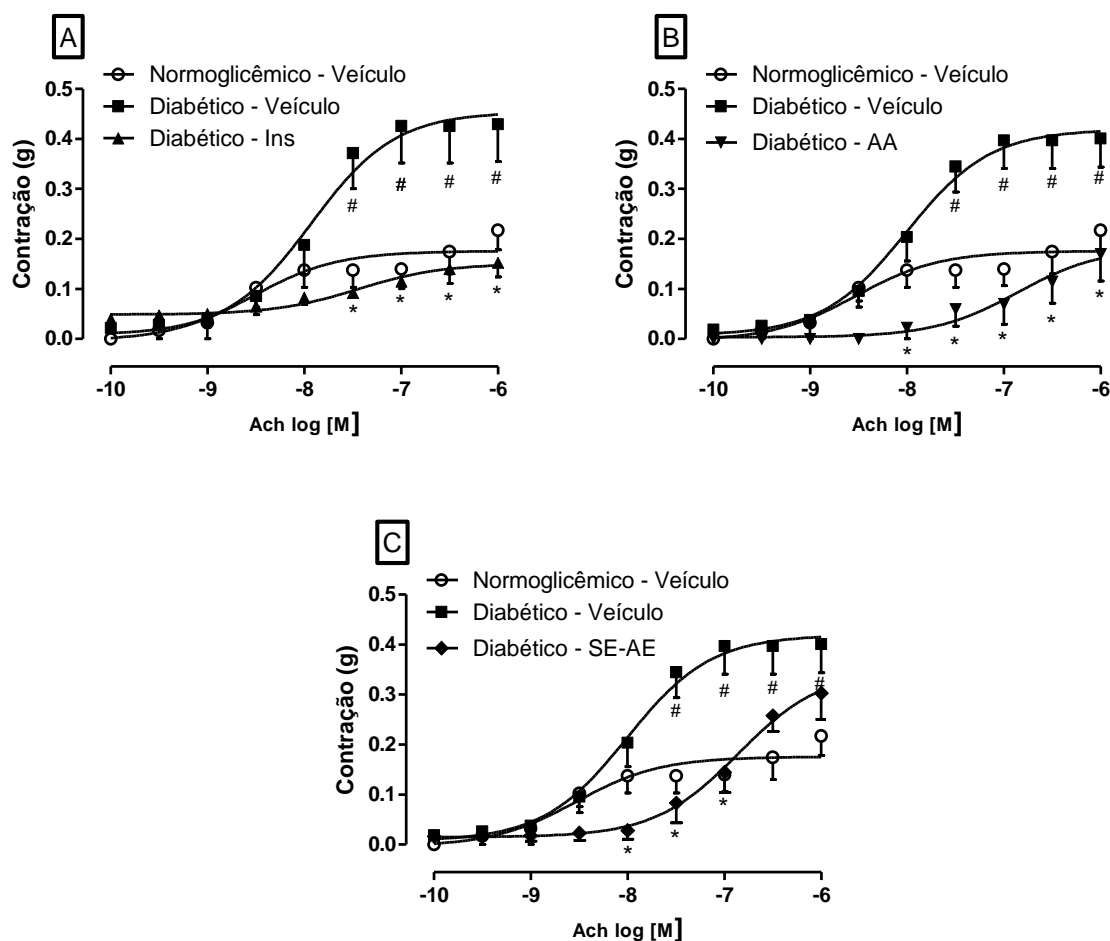


FIGURA 37: Efeito da fração SE-AE sobre a contração evocada por Ach (10^{-10} – 10^{-6} M) no piloro de ratas diabéticas. Os animais normoglicêmicos foram tratados com veículo (0,1mL/100g) e diabéticos foram tratados com veículo (0,1mL/100g), insulina (6UI/dia), ácido ascórbico (AA: 300 mg/kg) ou a fração SE-AE (1 mg/kg). Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. (n = 6). #p<0,05 quando comparado ao grupo normoglicêmico tratado com veículo e *p <0,05 quando comparado ao grupo diabético tratado com veículo. (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni)

Em segmentos teciduais do fundo gástrico de ratas diabéticas tratadas com veículo a resposta contrátil máxima observada na CCR à Ach (10^{-10} a 10^{-4} M) foi diminuída em 53% em relação a resposta observada nos animais normoglicêmicos tratados com veículo (E máx.: $3,0 \pm 0,28$ g de contração). Por outro lado, o tratamento com insulina (6UI/dia, figura 37A), ácido ascórbico (300 mg/kg, figura 37B) ou a fração SE-AE (1 mg/kg, figura 37C) restaurou a

resposta contrátil máxima do fundo gástrico para $3,0 \pm 0,36$; $2,4 \pm 0,73$ e $3,3 \pm 0,71$ g de contração, respectivamente.

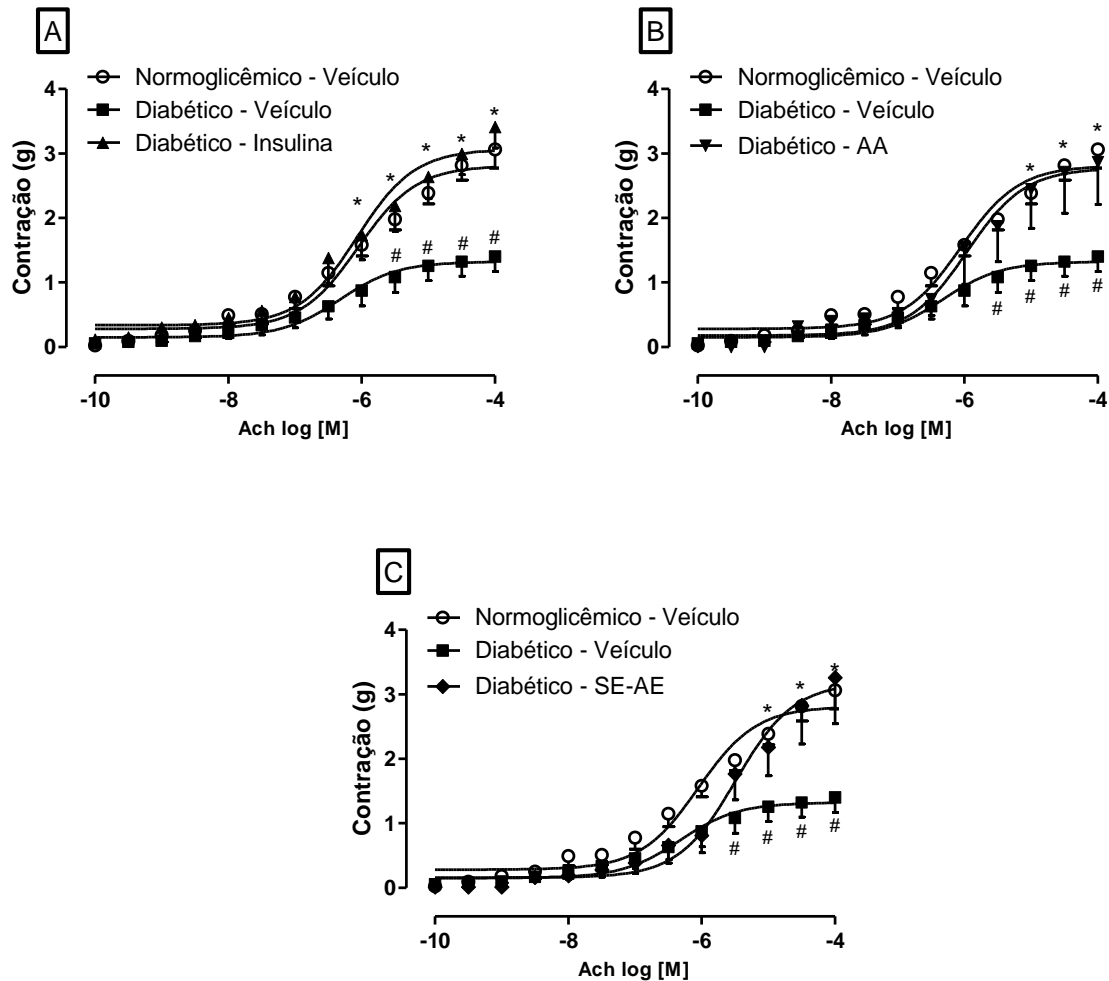


FIGURA 37: Efeito da fração SE-AE sobre a contração evocada por Ach (10^{-10} a 10^{-4} M) no fundo gástrico de ratos diabéticos. Os animais normoglicêmicos foram tratados com veículo (0,1mL/100g) e diabéticos foram tratados com veículo (0,1mL/100g), insulina (6UI/dia), ácido ascórbico (AA: 300 mg/kg) ou a fração SE-AE (1 mg/kg). Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. (n = 6-12). #p<0,05 quando comparado ao grupo normoglicêmico tratado com veículo e *p <0,05 quando comparado ao grupo diabético tratado com veículo. (ANOVA de duas via seguida pelo teste de Bonferroni)

4.8.4 Efeito da administração da fração SE-AE sobre relaxamento evocado pelo nitroprussiato de sódio (SNP) no fundo gástrico e piloro de ratas diabéticas.

Além das respostas contráteis, o efeito da fração SE-AE sobre o relaxamento do fundo e piloro gástrico de ratas diabéticas também foram mensurados. O relaxamento máximo observado na CCR para o SNP (10^{-10} a 10^{-5} M) do piloro de ratas diabéticas tratadas com veículo foi diminuído em 71% em relação a resposta observada no piloro de animais normoglicêmicos tratados com veículo (E máx.: $15,1 \pm 1,9\%$ de relaxamento). O tratamento com insulina (6UI/dia, figura 38A) e com a fração SE-AE (1mg/kg, figura 38C), mas não com ácido ascórbico (300 mg/kg, figura 38B), restaurou o relaxamento máximo do piloro de ratas diabéticas ao SNP para $58,1 \pm 10,1\%$ e $50,9 \pm 21,5\%$ de relaxamento, respectivamente.

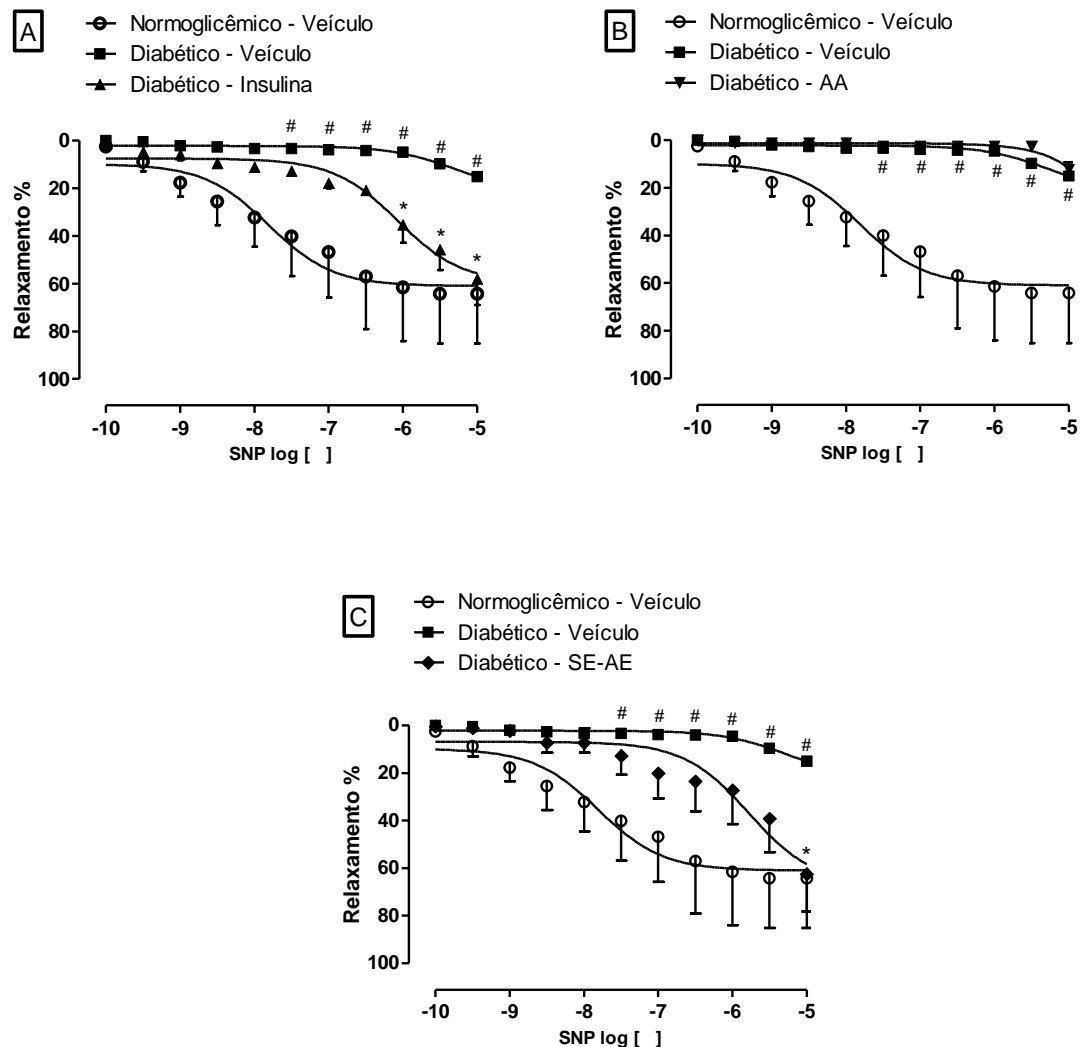


FIGURA 38: Efeito da fração SE-AE sobre o relaxamento evocado por SNP (10^{-10} – 10^{-5} M) no piloro de ratas diabéticas. Os animais normoglicêmicos foram tratados com veículo (0,1 mL/100g) e diabéticos foram tratados com veículo (0,1 mL/100g), insulina (6UI/dia), ácido ascórbico (AA: 300 mg/kg) ou a fração SE-AE (1 mg/kg). Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. ($n = 6$). # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo normoglicêmico tratado com veículo e * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo diabético tratado com veículo. (ANOVA de duas via seguida pelo teste de Bonferroni)

Em segmentos teciduais do fundo gástrico de ratas diabéticas tratadas com veículo o relaxamento observado na CCR ao SNP (10^{-10} a 10^{-5} M) não foi alterado em relação a resposta observada nos animais normoglicêmicos tratados com veículo (E máx.: $20,9 \pm 5,6\%$ de relaxamento). O tratamento com insulina (6UI/dia, fig. 39A), com ácido ascórbico (300

mg/kg, fig. 39B) ou a fração SE-AE (1mg/kg, fig. 39C) também não alterou a resposta ao SNP do fundo gástrico.

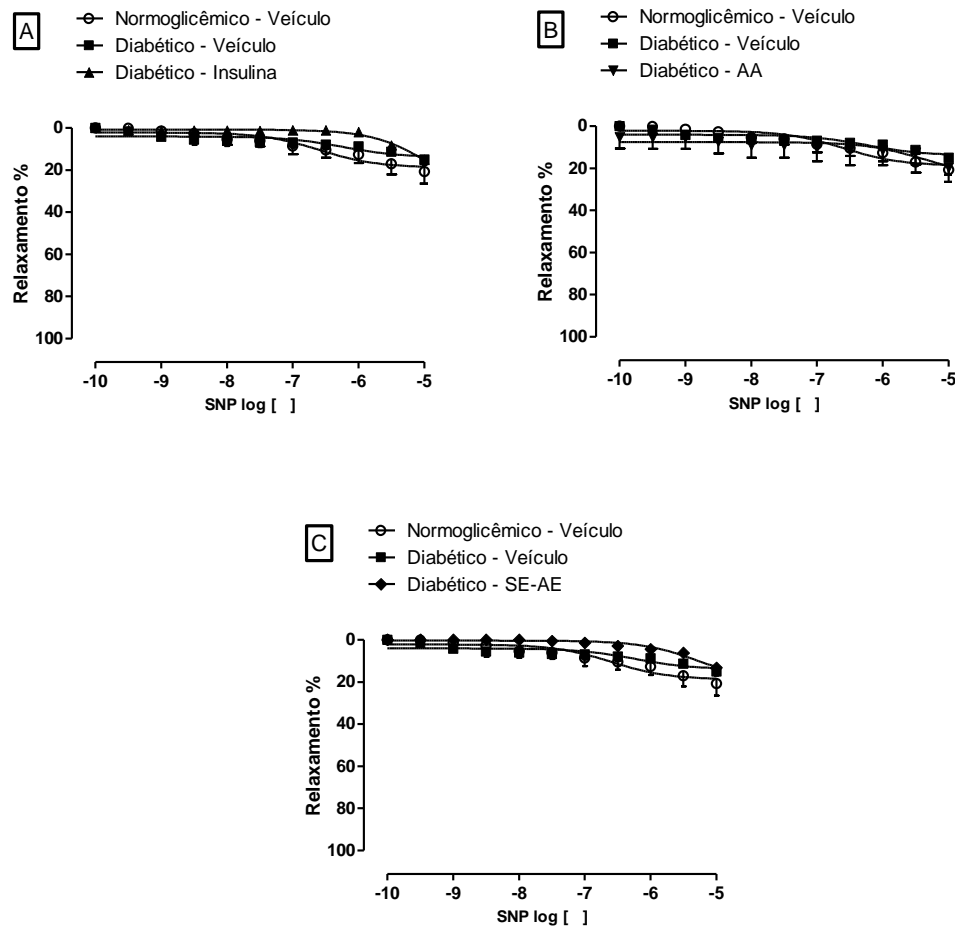


FIGURA 39: Efeito da fração SE-AE sobre o relaxamento evocado por SNP (10⁻¹⁰ a 10⁻⁵ M) no fundo gástrico de ratas diabéticas. Os animais normoglicêmicos foram tratados com veículo (Vei: 0.1mL/100g) e diabéticos foram tratados com veículo (0,1mL/100g), insulina (Ins.: 6UI/dia), ácido ascórbico (AA: 300 mg/kg) ou a fração SE-AE (1 mg/kg). Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. (n = 6-10). #p<0,05 quando comparado ao grupo normoglicêmico tratado com veículo e *p <0,05 quando comparado ao grupo diabético tratado com veículo. (ANOVA de duas via seguida pelo teste de Bonferroni).

4.8.5 Efeito da administração da fração SE-AE sobre relaxamento evocado pela estimulação elétrica no fundo gástrico ratas diabéticas.

Além do relaxamento evocado pelo SNP, o efeito da fração SE-AE no relaxamento nitrérgico através de estimulação elétrica do fundo gástrico de ratas diabéticas também foi avaliado. Os segmentos teciduais do fundo gástrico de ratas normoglicêmicas e diabéticas desenvolveram relaxamento nitrérgico em resposta a estimulação elétrica de campo (EEC) usando uma frequência de 8 Hz, que foi significativamente diminuído pela incubação com L-NAME (100 μ M) um inibidor da óxido nítrico síntase (Fig. 40) . Esse relaxamento foi acentuadamente reduzido nos animais diabéticos tratados com veículo ($7 \pm 4,5\%$ de relaxamento). Por outro lado, o tratamento com insulina (6 UI/dia), ácido ascórbico (300 mg/kg) ou a fração SE-AE (1 mg/kg) manteve o relaxamento nitrérgico em resposta a EEC em $35 \pm 8,6\%$, $37 \pm 3,3\%$ e $37 \pm 8,2\%$ de relaxamento, respectivamente.

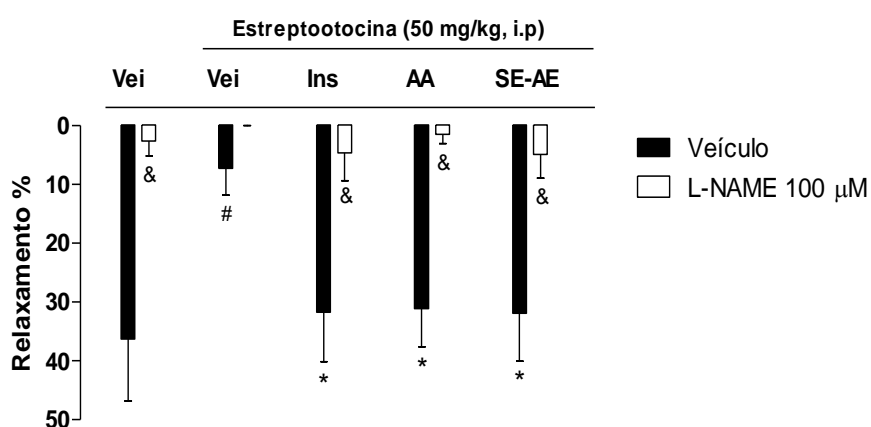


FIGURA 40: Efeito da fração SE-AE sobre o relaxamento evocado por ECC (8 HZ) no fundo gástrico de ratas diabéticas. Os animais normoglicêmicos foram tratados com veículo (Vei: 0.1mL/100g) e diabéticos foram tratados com veículo (0,1mL/100g), insulina (Ins.: 6UI/dia), ácido ascórbico (AA: 300 mg/kg) ou a fração SE-AE (1 mg/kg). Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. (n = 6-10). #p<0,05 quando comparado ao grupo normoglicêmico veículo incubado com veículo, *p <0,05 quando comparado ao grupo diabético veículo incubado com veículo, & p<0,05 quando comparado ao mesmo grupo incubado com L-NAME (100 μ M). (ANOVA de uma e de duas via seguida pelo teste de Bonferroni).

4.8.6 Efeito da administração da fração SE-AE sobre os níveis de expressão da NOS1 no corpo gástrico de ratas diabéticas.

Como indicado na figura 41, o nível de expressão da NOS1 no corpo gástrico de ratas diabéticas tratadas com veículo foi aumentado em 68%, quando comparada com o grupo normoglicêmico tratado com veículo (Vei: $0,6 \pm 0,09$). Contudo, a expressão da enzima NOS1 em animais diabéticos tratados com insulina (6UI/dia), ácido ascórbico (300 mg/kg) ou a fração SE-AE (1 mg/kg) foi restaurada para $1,0 \pm 0,05$; $0,9 \pm 0,2$ e $0,8 \pm 0,18$, respectivamente.

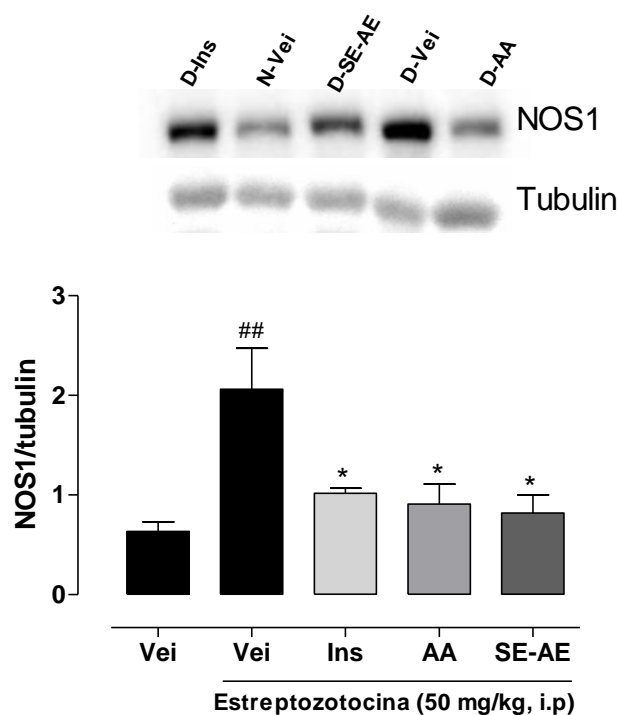


FIGURA 41: Efeito da fração SE-AE sobre a expressão da NOS1 no corpo gástrico de ratas diabéticas. Os animais normoglicêmicos foram tratados com veículo (Vei: 0,1mL/100g) e diabéticos foram tratados com veículo (Vei: 0,1mL/100g), insulina (Ins: 6UI/dia), ácido ascórbico (AA: 300 mg/kg) ou a fração SE-AE (1 mg/kg). Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. (n = 6). ## $p < 0,01$ quando comparado ao grupo normoglicêmico tratado com veículo e * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo diabético tratado com veículo. (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

4.8.7 Efeito da administração da fração SE-AE sobre os neurônios mioentéricos NADPH-diaforase positivos da região gástrica glandular (corpo e antro) de ratas diabéticas.

Para avaliar alterações no número de neurônios nitrérgicos, a técnica histoquímica de NADPH-diaforase foi realizada. No preparado de membrana, os neurônios NADPH-diaforase positivos do plexo mioentérico da região glandular de ratas apresentou-se constituído por neurônios de diferentes tamanhos reunidos em gânglios de distribuição esparsa e por neurônios isolados. Em ratas diabéticas tratadas com veículo, o número de neurônios mioentéricos NADPH-diaforase positivos por $95,87 \text{ mm}^2$ da região gástrica glandular foi aumentado em 44% na curvatura menor (fig. 42A) e em 53 % na curvatura maior (fig. 42B), quando comparado aos animais normoglicêmicos tratados com veículo (Vei: $364 \pm 29,9$ e $340 \pm 44,9$, respectivamente). O tratamento com insulina (6UI/dia), ácido ascórbico (300 mg/kg) ou a fração SE-AE (1 mg/kg) manteve o número de neurônios NADPH-diaforase positivos por $95,87 \text{ mm}^2$ na curvatura glandular menor de ratas diabéticas em $403 \pm 17,5$; $370 \pm 44,2$; $295 \pm 30,8$, respectivamente, e na curvatura glandular maior de ratas diabéticas para $348 \pm 19,2$; $333 \pm 22,7$ e $323 \pm 37,8$, respectivamente. Além disso, como representado na tabela 6, não houve diferença entre a área da mucosa gástrica dos animais provenientes dos diferentes grupos experimentais, indicando que o aumento no número de neurônios não está associado com alterações na área da superfície gástrica.

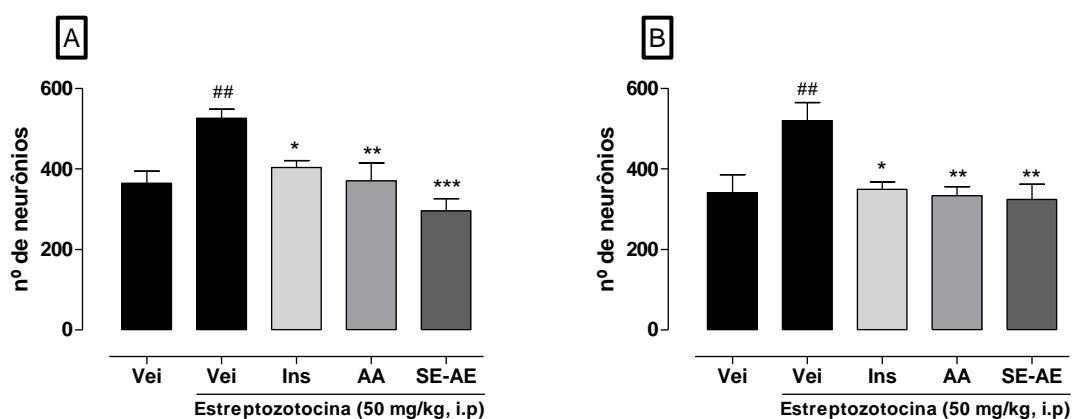


FIGURA 42: Efeito da fração SE-AE sobre os neurônios mioentéricos NADPH-diaforase positivos da região gástrica glandular (corpo e antro) de ratas diabéticas. Os animais normoglicêmicos foram tratados com veículo (Vei: 0,1mL/100g) e diabéticos foram tratados com veículo (Vei: 0,1mL/100g), insulina (Ins: 6UI/dia), ácido ascórbico (AA: 300 mg/kg) ou a fração SE-AE (1 mg/kg). Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. (n = 6). ^{##}p<0,01 quando comparado ao grupo normoglicêmico tratado com veículo e ^{*}p <0,05, ^{**}p <0,01 quando comparado ao grupo diabético tratado com veículo. (ANOVA de duas via seguida pelo teste de Bonferroni).

TABELA 6: Área da superfície gástrica de ratas dos diferentes grupos experimentais.

		Área (mm ²)
Tampão citrato (0,1 mL/kg)	Veículo (0,1 mL/100g)	17 \pm 1,2
Estreptozotocina (50 mg/kg, i.p)	Veículo (0,1 mL/100g)	15 \pm 0,4
	Insulina (6 UI/dia)	17 \pm 1,4
	Ác. ascórbico (300 mg/kg)	17 \pm 0,8
	SE-AE (1mg/kg)	14 \pm 0,8

Resultados foram expressos como média \pm E.P.M. (n = 6). (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni)

Imagens dos neurônios NADPH-diaforase positivos de preparados de membrana de ratas normoglicêmicas tratadas com veículo (curvatura menor: fig. 43A, curvatura maior: fig 43B) e de ratas diabéticas tratadas com veículo (curvatura menor: fig. 43C, curvatura maior: fig 43D), insulina curvatura menor: fig. 43E, curvatura maior: fig 43F, ácido ascórbico (curvatura menor: fig. 43G, curvatura maior: fig 43H), ou fração SE-AE (curvatura menor: fig. 43I, curvatura maior: fig 43J) estão representadas abaixo:

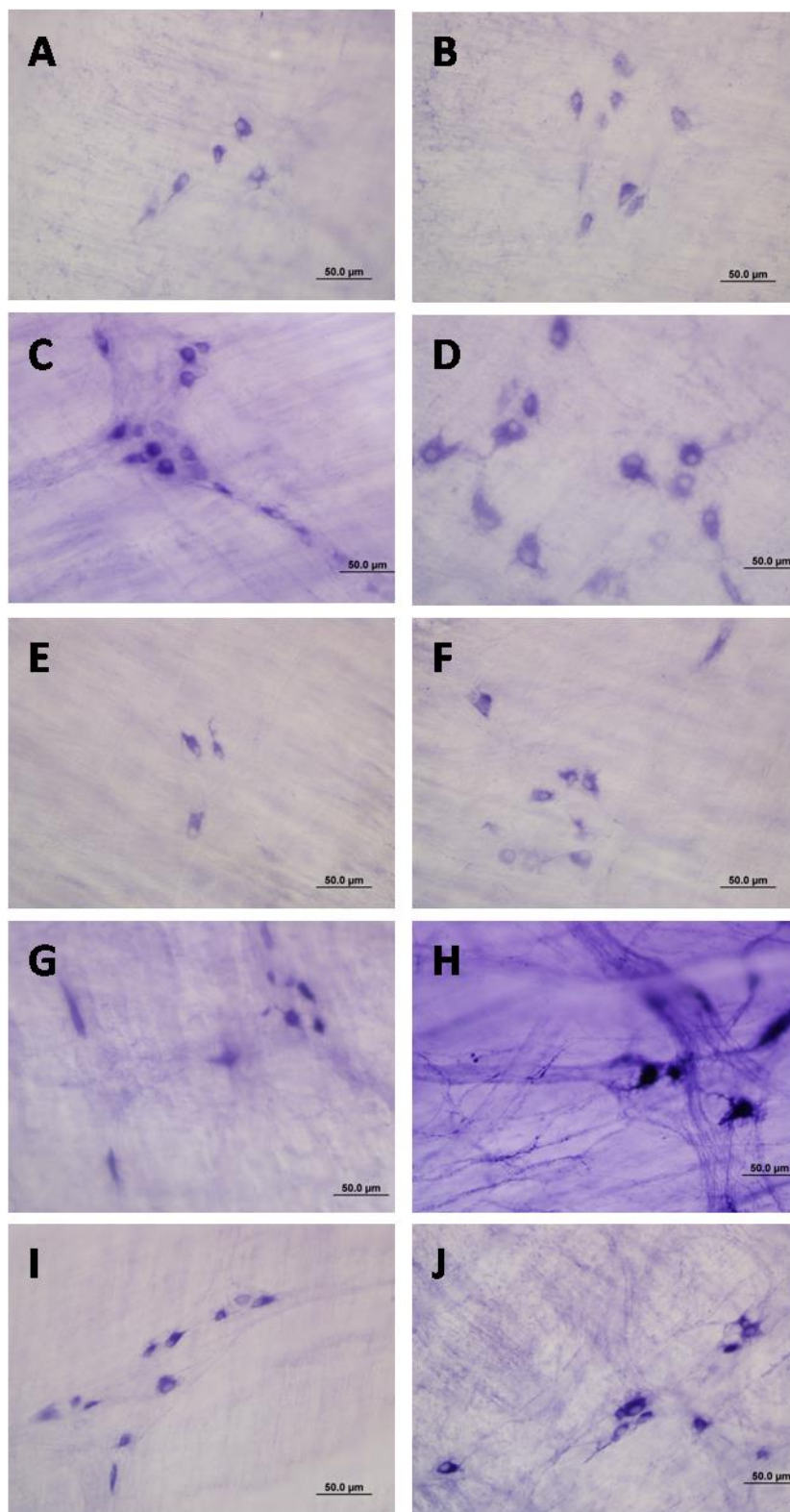


FIGURA 43: Imagens representativas dos neurônios mioentéricos NADPH-diaforase positivos da região gástrica glandular (corpo e antro) de ratas normoglicêmicas tratadas com veículo (curvatura menor: fig. 43A, curvatura maior: fig 43B) e de ratas diabéticas tratadas com veículo (curvatura menor: fig. 43C, curvatura maior: fig 43D), insulina (curvatura menor:

fig. 43E, curvatura maior: fig 43F), ácido ascórbico (curvatura menor: fig. 43G, curvatura maior: fig 43H), ou fração SE-AE (curvatura menor: fig. 43I, curvatura maior: fig 43J) (aumento de 400x, escala: 50 μm).

5. DISCUSSÃO

O potencial gastroprotetor e cicatrizante gástrico das raízes de bardana já foram estabelecidos em estudos prévios de nosso grupo de pesquisa (DOS SANTOS, 2010; DA SILVA, 2013). No entanto, as informações sobre os efeitos de extratos, frações ou compostos isolados das folhas da bardana sobre o trato gastrointestinal ainda são escassos. Por conseguinte, neste trabalho foram investigados os efeitos gastroprotetor e cicatrizante gástrico das folhas da bardana, assim como sua atividade sobre a função motora gástrica em ratas sob condições normais e aumentadas de glicemia. Além do mais, ao contribuir para a validação do uso terapêutico ou para a prospecção de compostos biologicamente ativos obtidos das folhas da bardana, esse trabalho almejou colaborar para um melhor aproveitamento do cultivo da espécie, uma vez que as folhas são descartadas durante a colheita da planta para obtenção da raiz para fins terapêuticos ou culinários.

A análise toxicológica aguda em camundongos do extrato solúvel em etanol (SE) obtido das folhas da bardana foi realizada com objetivo de determinar as reações adversas em curto prazo após a administração do extrato. De acordo com a DL50 (10,8208 g/kg para a via oral e 1,6266 g/kg para a via intraperitoneal), baseados na classificação de SCHUARTSMAN (1980) o SE quando administrado por via intraperitoneal, pode ser considerado moderadamente tóxico, enquanto que pela DL50 por via oral pode ser considerado pouco tóxico. Assim diante dessas informações os experimentos foram continuados e as doses utilizadas foram pelo menos 1000 vezes inferior à DL50 da via administrada.

A úlcera gástrica é uma doença que acomete mundialmente muitas pessoas e tem incidência e prevalência em constante aumento (MALFERTHEINER *et al.*, 2009). É caracterizada pela presença de uma lesão necrótica profunda que acomete tanto a mucosa como a camada muscular da mucosa (TARNAWSKI *et al.*, 1991 e 2005) e que após a cicatrização pode ser recorrente e reaparecer ao longo da vida do paciente (KANGWAN *et al.*, 2014). Basicamente, o desenvolvimento da úlcera gástrica é resultado de um desequilíbrio entre os mecanismos de defesa da mucosa, incluindo o muco, o bicarbonato, PGs e o fluxo sanguíneo; e os fatores agressores à mucosa, tais como o ácido clorídrico e a pepsina na superfície luminal gástrica (TARNAWSKI, 2005). Ademais, o estresse, a infecção por *H. pylori* e o uso a longo prazo de AINEs são importantes fatores que favorecem a agressão à

mucosa gástrica e estão implicados no estabelecimento e recorrência das úlceras gástricas nos dias atuais (GRAHAM, 2014; WANG *et al.*, 2007).

O tratamento das úlceras gástricas incluem a utilização de medicamentos antisecretores como os antagonistas dos receptores H₂ e os inibidores da bomba de prótons (IBPs) (KANGWAN *et al.*, 2014). A utilização de antimicrobianos para a erradicação da *H. pylori* (EL-ZAHABY *et al.*, 2014), e abordagens endoscópicas (CALVET *et al.*, 2005) ou cirúrgicas (LEME *et al.*, 2003) para o tratamento da úlcera hemorrágica, assim como alterações na terapia com AINEs também são estratégias terapêuticas para casos específicos (DEEKS *et al.*, 2013). Apesar da eficácia terapêutica, estudos apontam que a supressão ácida ou a erradicação da *H. pylori* são insuficientes para um processo cicatricial completo e assim aumentam a probabilidade de recorrência da úlcera (KANGWAN *et al.*, 2014). Desta forma, devido ao freqüente ressurgimento da úlcera, é necessário que o tratamento com fármacos antisecretores seja mantido por um longo período de tempo (TANG e CHAN, 2012). Entretanto, o tratamento prolongado com esses fármacos pode causar efeitos adversos graves, tais como a osteoporose e a hipergastrinemia que pode desencadear a hiperplasia de células ECL e o desenvolvimento de tumores carcinóides na mucosa gástrica (POYNTER *et al.*, 1985; PENSTON e WORMSLEY 1986; SHEEN e TRIADAFILOPOULOS, 2011). Neste contexto clínico, tratamentos que melhorem a qualidade da cicatrização das úlceras gástricas e com menos efeitos colaterais são necessários. Por esta razão, estudos com novas alternativas terapêuticas são importantes e, dentre estas, as plantas medicinais, têm constituído importante fonte de moléculas bioativas.

O modelo de úlcera gástrica induzida por etanol é o empregado na investigação dos efeitos gastroprotetores de substâncias (REPETTO e LLESUY, 2002). O etanol promove ulcerações hemorrágicas na mucosa gástrica através de vários mecanismos, incluindo a redução da barreira de muco, da secreção de bicarbonato e da disponibilidade de grupos sulfidrílicos não-proteicos na mucosa gástrica (SZABO *et al.*, 1985; WALLACE, 2001), além do mais aumenta a permeabilidade vascular e promove perda de células do epitélio gástrico (REPETTO e LLESUY, 2002). Neste modelo, a administração oral do extrato SE e da fração SE-AE protegeu a mucosa gástrica de ratas, confirmando os dados obtidos por CARLOTTO (2013). Além disso, a administração intraperitoneal do extrato e da fração também exibiu atividade citoprotetora semelhante, afastando a possibilidade de que o efeito gastroprotetor do SE e da fração SE-AE seja unicamente devido a formação de uma barreira física sobre a

mucosa gástrica. Como esperado, o tratamento com omeprazol, utilizado como controle positivo do ensaio, também reduziu as lesões gástricas induzidas etanol. Similarmente, Dos SANTOS e colaboradores (2008) também verificaram o efeito gastroprotetor do extrato clorofórmico da raiz da bardana contra as lesões gástricas induzidas por etanol e mais recentemente, no único estudo sobre gastroproteção das folhas da bardana, De ALMEIDA e colaboradores (2012) também demonstraram o efeito gastroprotetor da fração rica em onopordopicrina, uma lactona sesquiterpenica, em úlceras induzidas por etanol acidificado.

Estudos prévios já descreveram a presença de flavonóides tais como a rutina, a quercitrina, a quercetina e a luteolina e de ácidos fenólicos, incluindo ácido caféico, benzóico, p-cumárico e clorogênicos (especificamente o ácido 3-O-cafeoilquínico e cinarina) nas folhas de *A. lappa* (FERRACANE *et al.*, 2009; LOU *et al.*, 2010). De fato, o extrato SE é composto de isômeros de ácido mono- e di-cafeoilquínicos. Esses dados são corroborados por nosso estudo anterior, o qual também demonstrou a presença de ácidos hidroxicinamoilquínicos, principalmente dicafeoilquínicos, no extrato etanólico bruto das raízes da bardana (Da SILVA *et al.*, 2013). O composto majoritário na fração ativa SE-AE foi identificado como sendo o ácido 1,3-*O*-dicafeoilquínico (1,3-DCQA), o qual também apresentou atividade gastroprotetora no modelo de úlcera induzida por etanol, porém em uma dose extremamente reduzida. De forma interessante, durante a partição líquido: líquido, a fração butanólica concentrou grande quantidade de cinarina [ácido 1,5-*O*-dicafeoilquínico (1,5-DCQA)] e apesar da grande semelhança estrutural com o composto ativo 1,3-DCQA, nem a fração SE-B e nem o composto 1,5-DCQA apresentaram atividade gastroprotetora nas doses avaliadas. Desta forma, fica evidente que o composto 1,3-DCQA é um potencial candidato para os efeitos gastroprotetores das folhas da bardana e que as hidroxilas vicinais geometricamente projetadas no mesmo plano são grupos farmacofóricos de grande importância para a gastroproteção.

Dada a confirmação do efeito gastroprotetor das folhas da bardana e a identificação de um composto ativo, nós prosseguimos investigando os mecanismos envolvidos nesse efeito e a primeira hipótese avaliada foi a participação de fatores protetores da mucosa. Contudo, devido a pouca quantidade do composto 1,3-DCQA, tais experimentos foram conduzidos utilizando a fração SE-AE.

Grupos sulfidrílicos não protéicos (NP-SH) como a GSH desempenham papel crucial na regulação de reações de redução e oxidação intracelular, controlando a redução e a inativação de EROs (JMATTHEWS *et al.*, 2006). Apesar do exposto, o efeito gastroprotetor da fração SE-AE foi mantido em animais pré-tratados com N-etilmaleimida (NEM), um agente que promove a alquilação e inativação de NP-SH (TAKEUCHI *et al.*, 1989), indicando que a disponibilidade de tais compostos não é primordial no efeito gastroprotetor da fração. Haja vista que a fração SE-AE foi eficaz no seqüestro do radical livre DPPH, é provável que esse efeito restitua o equilíbrio redox mesmo em vigência da inativação dos NP-SH da mucosa gástrica. Em contraste, no estudo de De ALMEIDA e colaboradores (2012) a fração rica em onopordopicrina obtida das folhas da bardana teve o efeito gastroprotetor abolido pela administração de NEM. As prostaglandinas são responsáveis pela secreção de muco e bicarbonato na mucosa gástrica, além de favorecerem o fluxo sanguíneo local e por tais motivos são primordiais na manutenção da integridade da mucosa gástrica (PALILEO e KAUNITZ, 2011). De forma interessante, o efeito gastroprotetor da fração SE-AE no modelo de úlcera induzida por etanol foi abolido em animais pré-tratados com indometacina. Vale ressaltar que, a dose administrada de indometacina não produz lesões gástricas agudas (dado não mostrado), e é utilizada para potencializar a ação necrotizante do etanol como classicamente proposto por KONTUREK e colaboradores (1987). Classicamente os distúrbios gastrointestinais adversos desse medicamento são atribuídos à sua capacidade de inibição da COX-1 e conseqüente diminuição da síntese de PGs, que como descrito acima são responsáveis pela modulação de vários componentes envolvidos na defesa da mucosa gástrica (KONTUREK, 2005). Portanto, diante do resultado obtido, podemos sugerir que um dos mecanismos envolvidos na gastroproteção desempenhada pela fração SE-AE está relacionado à síntese e/ou a disponibilidade de PGs na mucosa gástrica.

Além de os AINEs promoverem lesões gástricas através da diminuição da síntese de PGs, o contato desses fármacos com a mucosa gástrica também promove efeitos irritantes diretos (FIORUCCI *et al.*, 2001), através da degradação de fosfolipídios presentes tanto no muco aderido quanto nas membranas celulares do epitélio gástrico, o que reduz a hidrofobicidade do muco e favorece a retrodifusão de íons hidrogênio (BERSTAD, 2002). Por tais características, em doses adequadas, os AINEs podem ser empregados como agentes ulcerogênicos em modelo de úlcera gástrica aguda. Como esperado, no modelo de úlcera aguda induzida por indometacina, tanto o tratamento com omeprazol, como com PGE₂,

utilizados como controles positivos do ensaio, reduziram as lesões gástricas. Similarmente, a fração SE-AE também foi capaz de promover gastroproteção nas doses de 0,15 e 1,5 mg/kg, confirmando que a gastroproteção contra a indometacina exibida pela fração SE-AE esteja intimamente relacionada com mecanismos relacionados ao aumento da síntese ou disponibilidade de PGs. Contudo, considerando que além do seqüestro do radical livre DPPH, a fração SE-AE também foi capaz de inibir diretamente a atividade da mieloperoxidase (MPO), uma enzima lisossomal com papel fundamental na produção de EROs dependente de neutrófilo (BRADLEY *et al.*, 1982), é plausível que a gastroproteção da fração SE-AE contra a indometacina ou etanol pode ser decorrente de seus efeitos antioxidantes. De fato, a importância do estresse oxidativo e da migração leucocitária na ulcerogênese por indometacina já foram descritas na literatura, em trabalhos que demonstraram que a administração do inibidor de xantina oxidase alopurinol (NAITO *et al.*, 1995) e a inibição da migração neutrofílica pela administração intraperitoneal de um anticorpo anti-neutrófilo (SUZUKI *et al.*, 2000) atenuam a lesão gástrica induzida por indometacina

Pela importante função atribuída as EROs na etiologia das úlceras gástricas, em geral terapias que aumentem os níveis de GSH são consideradas benéficas no tratamento dessas doenças (KAPLAN *et al.*, 2012). Ainda que, como descrito anteriormente, a fração SE-AE promova gastroproteção mesmo quando os NP-SH estejam inativados por um agente alquilante, a manutenção dos níveis de GSH na mucosa gástrica exposta ao etanol ou a indometacina também participa da gastroproteção promovida pela fração SE-AE.

O muco aderido à mucosa gástrica é um importante fator de proteção tecidual (VASCONCELOS *et al.*, 2008), composto por uma camada de glicoproteínas dispostas em gel, insolúveis em água, que protegem a mucosa contra danos provocados pelo ácido clorídrico e pela pepsina (BERNE *et al.*, 2004). Similarmente ao efeito nos níveis de GSH, a manutenção dos níveis de muco aderido na mucosa gástrica também participa da gastroproteção promovida pela fração SE-AE nos modelos de úlcera aguda induzida por etanol ou indometacina.

Os resultados discutidos até este ponto indicam o envolvimento de fatores protetores da mucosa gástrica na gastroproteção efetuada pela fração SE-AE. A julgar por esta atividade em dose tão reduzida, nos interessou avaliar também a atividade cicatrizante gástrica da

referida fração em um modelo animal de úlcera gástrica crônica, a úlcera induzida por ácido acético 80%.

As úlceras induzidas por ácido acético possuem localização, severidade e cronicidade semelhantes às úlceras humanas, além de possuírem similaridades em relação ao processo de cicatrização (TAKAGI *et al.*, 1969). Tal modelo é confiável e utilizado mundialmente para avaliação do potencial cicatrizante gástrico de substâncias (OKABE e AMAGASE, 2005). A úlcera por ácido acético ocorre por alterações de múltiplos fatores, tais como alterações nos níveis de PGs, de diversos fatores de crescimento e citocinas, além de mudanças no padrão de aderência do muco e alterações na microcirculação (KOBAYASHI *et al.*, 2001). Histologicamente a úlcera gástrica produzida pela exposição da serosa ao ácido acético é composta de duas estruturas principais: a margem, chamada de zona de cicatrização, e a base da úlcera, formada basicamente por fibroblastos, macrófagos, células linfóides e células endoteliais (TARNAWSKI, 2005). A cicatrização dessa lesão é um processo ativo, complexo e orquestrado para reconstrução da mucosa, envolve a formação de tecido de granulação na base da úlcera, a formação de novos vasos e a proliferação celular na margem da lesão para o restabelecimento da arquitetura glandular (KONTUREK *et al.*, 2005). Neste modelo, o tratamento dos animais com a fração SE-AE (1 mg/kg), duas vezes ao dia, por sete dias, acelerou o processo de cicatrização da lesão induzida por ácido acético. Este resultado foi confirmado pelas análises histológicas, onde foi possível observar a contração da base da úlcera acompanhada de uma maior continuidade tecidual da região da margem da lesão. Fortalecendo nossos dados, Dos SANTOS e colaboradores (2008) e Da SILVA e colaboradores (2013) também demonstraram ação cicatrizante gástrica para extratos da bardana. Entretanto os extratos testados em ambos os estudos foram obtidos das raízes da planta e as doses eficazes dos mesmos foram maiores em relação à dose eficaz da fração SE-AE. Como esperado, o tratamento com omeprazol, utilizado como controle positivo do ensaio, também foi eficaz na redução da extensão das úlceras induzidas por ácido acético.

Considerando que o muco gástrico também é importante durante o processo de cicatrização por efetuar a proteção das células da mucosa gástrica, o efeito da fração SE-AE sobre os níveis de mucina em úlceras crônicas induzidas por ácido acético também foi mensurado pelo método histoquímico de PAS. Nessa técnica, o ácido periódico oxida seletivamente os resíduos de glicose, produzindo aldeídos que reagem com o reagente de Schiff e confere uma cor final púrpura-magenta, revelando a presença de macromoléculas de

carboidratos como glicoproteínas, glicogênio e proteoglicanos, tipicamente encontrados no muco. Como previsto, a exposição da mucosa gástrica ao ácido acético reduziu os níveis de mucina e o tratamento com a fração SE-AE restaurou esses níveis. Esse resultado aponta que a preservação do muco gástrico está envolvido tanto na atividade gastroprotetora quanto no efeito cicatrizante gástrico da fração SE-AE e vão de encontro ao observado em nosso trabalho anterior onde os efeitos cicatrizantes gástricos promovidos pelo extrato bruto etanólico das raízes da bardana também envolveram a manutenção do muco gástrico (Da SILVA *et al.*, 2013).

O processo inflamatório estabelecido no desenvolvimento da úlcera gástrica envolve o recrutamento e ativação de neutrófilos através de agentes quimiotáticos, promovendo a liberação de EROs e proteases, resultando em um dano tecidual inflamatório dependente de neutrófilos (FIALKOW *et al.*, 2007). Como descrito anteriormente, a MPO é uma enzima peroxidase presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, que promove a formação de espécies reativas de oxigênio para auxiliar na destruição de agentes patogênicos (ARNHOLD *et al.*, 2003). Como a MPO é descrita como um marcador indireto da infiltração de neutrófilos na resposta inflamatória (BRADLEY *et al.*, 1982), a mensuração dos níveis de atividade desta enzima foi realizada para a análise desse parâmetro nas úlceras gástricas induzidas por ácido acético. É sabido que na úlcera gástrica a atividade da MPO está intimamente relacionada com o estado da úlcera, estando frequentemente elevada no sítio da lesão e diminuída após a cicatrização da úlcera (SATO *et al.*, 1997). Portanto, o aumento da atividade da MPO decorrente da exposição da serosa gástrica ao ácido acético evidencia o aumento da infiltração de neutrófilos no local da lesão. O tratamento com a fração SE-AE foi capaz de diminuir os níveis de atividade da MPO, sugerindo redução da infiltração de neutrófilos na área ulcerada. Adicionalmente, a inibição direta da MPO pela fração SE-AE também contribui para a redução da formação de EROs oriundas de neutrófilos e conseqüentemente para o efeito cicatrizante gástrico da fração.

Reforçando o fato de que o estresse oxidativo tem grande importância na ulceração gástrica e que o sistema antioxidante é fundamental para a reconstrução da área lesada, as alterações oxidativas promovidas pela exposição ao ácido acético e o efeito do tratamento com a fração SE-AE nessas alterações também foram avaliadas. A geração de EROs como radical hidroxila (OH^\cdot), o ânion superóxido (O_2^\cdot) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), entre outros fatores, através da intensa atividade de células fagocitárias no sítio da lesão gástricas,

induzem constantemente o dano oxidativo (TANDON *et al.*, 2004). Similarmente ao efetuado em Da SILVA e colaboradores (2013), a produção intracelular de radicais livres foi investigada usando a sonda fluorescente 2',7'-diclorfluoresceína-diacetato (DCFH-DA), a qual após ser oxidada por espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio emite fluorescência nos comprimentos de onda de 485 e 520 nm, para excitação e emissão, respectivamente. Como esperado, foi observado um significativo aumento nos níveis de radicais livres intracelulares na mucosa gástrica ulcerada por ácido acético. Contudo, o tratamento com a fração SE-AE foi capaz de diminuir a geração de radicais livres intracelulares no sítio da lesão. Em contrapartida a produção de EROs, a mucosa gástrica dispõe de potentes defesas antioxidantes (TANDON *et al.*, 2004). Como descrito anteriormente, a GSH participa ativamente dessas defesas por ser um potente antioxidante e também substrato para várias enzimas antioxidantes, tais como: glutatona-S-transferase (GST), glutatona peroxidase (GPx) e glutatona redutase (GR) (CNUBBEN *et al.*, 2001). Como previsto, os níveis de GSH foram reduzidos após a exposição da mucosa gástrica ao ácido acético e restituídos para níveis basais pelo tratamento com a fração SE-AE, reiterando que o restabelecimento do equilíbrio redox é promovido durante o efeito cicatrizante gástrico da fração. De forma análoga, em nosso estudo anterior, tanto a redução dos níveis de EROs intracelular como o restabelecimento do conteúdo de GSH gástrico também foram descritos na atividade cicatrizante gástrica do extrato etanólico da raiz da bardana (Da SILVA *et al.*, 2013).

Frente ao discutido, a promoção de fatores protetores da mucosa gástrica como o muco e as defesas antioxidantes participam tanto do efeito gastroprotetor como do cicatrizante gástrico da fração SE-AE. Contudo, substâncias antiulcerogênicas podem agir por dois modos de ação, um relacionado ao aumento da resistência da mucosa gástrica contra fatores agressivos endógenos ou exógenos, e outro relacionado à supressão da secreção ácida gástrica (ALLEN, 1993). Como a participação de fatores protetores nos efeitos da fração SE-AE na mucosa gástrica já foi evidenciada, a atividade antissecretora da fração foi avaliada na continuidade deste estudo.

A secreção ácida constitui um fator agressor da mucosa gástrica e juntamente com a pepsina contribui para o aparecimento e desenvolvimento de lesões gástricas. Por tal motivo, os medicamentos mais amplamente comercializados nos dias de hoje para o tratamento de úlceras são os fármacos antissecretores (GILL *et al.*, 2011). No entanto, a fração SE-AE, quando administrada por via oral, intraduodenal ou intraperitoneal não foi capaz de alterar o

volume e a acidez total do conteúdo gástrico em animais com hipersecreção induzida por ligadura do piloro. Além disso, a fração também não inibiu *in vitro* a atividade da enzima H^+/K^+ -ATPase ou bomba de próton, a qual constitui a etapa final da produção de HCl no lúmen estomacal, descartando a possibilidade de mecanismos antissecretores da fração SE-AE. Em contraste, Da SILVA e colaboradores (2013) demonstraram a participação da supressão ácida no efeito cicatrizante gástrico do extrato bruto etanólico obtido das raízes da bardana. Tais diferenças indicam que, dada a diversidade dos compostos ativos, diferentes partes da bardana apresentam diferentes mecanismos envolvidos na atividade gastroprotetora.

A supressão ácida gástrica também protege a mucosa gástrica através da redução da atividade péptica do suco gástrico (HUANG e HUNT, 1996). Visto que em meio ácido, o pepsinogênio secretado pelas células principais é catalisado em sua forma ativa, a pepsina, que por suas atividades proteolíticas também é um agente agressor da mucosa gástrica (RAUFMAN, 1996). Reforçando a ausência de mecanismos antissecretores nos efeitos da fração, em nossos experimentos somente a administração de omeprazol reduziu a atividade péptica do conteúdo gástrico de ratas.

Ainda em relação aos estímulos da secreção ácida, o aumento dos níveis plasmáticos da gastrina é verificado durante a supressão ácida promovida por drogas antissecretoras (ANDRIULLI *et al.*, 1991). Tal fenômeno está associado com o desenvolvimento de tolerância aos antagonistas dos receptores H_2 e à hiperplasia de células parietais observadas com o uso prolongado de IBPs (HASHIMOTO *et al.*, 2007; QVIGSTAD *et al.*, 1998; STOLTE *et al.*, 1992; KARASAWA *et al.*, 1988). Além disso, em especial na terapia prolongada com IBPs, a hipergastrinemia persistente pode promover várias alterações histológicas, incluindo o aparecimento de pólipos na mucosa gástrica (STOLTE *et al.*, 1992; KARASAWA *et al.*, 1988). Realmente, em nossos experimentos, a administração de omeprazol em animais não ulcerados, durante sete dias, promoveu o aumento dos níveis séricos de gastrina. Da mesma forma, KONAGAYA e colaboradores (2001) também observaram a hipergastrinemia decorrente da administração de omeprazol em ratos após sete dias do início do tratamento. Pela ausência de atividade antissecretora, animais tratados com a fração SE-AE durante o mesmo período não desenvolveram hipergastrinemia.

Todavia, apesar dos efeitos prejudiciais associados à prolongada hipergastrinemia decorrente do uso em longo prazo de supressores ácidos, alguns estudos apontam a

importância da gastrina durante a cicatrização de úlceras gástricas (BRZOZOWSKI *et al.*, 1999; KONTUREK *et al.*, 2008; OPOKA *et al.*, 2010). Por tal razão, os níveis séricos de gastrina também foram mensurados em animais ulcerados pelo ácido acético. De forma interessante, esses níveis foram aumentados em todos os animais ulcerados por ácido acético. Contudo, o tratamento com a fração SE-AE aumentou ainda mais a gastrinemia nesses animais. Alguns trabalhos indicam a participação da gastrina na cicatrização gástrica promovida por substâncias como a colecistocinina (BRZOZOWSKI, *et al.*, 1999), a melatonina (KONTUREK *et al.*, 2008) e o hidroaspartato de zinco (OPOKA *et al.*, 2010). Apesar das evidências, os mecanismos mediados pela gastrina durante a cicatrização da mucosa gástrica ainda precisam ser elucidados e até o momento somente o aumento da proliferação celular na margem da úlcera foi postulado (BRZOZOWSKI *et al.*, 1999). Desta forma é possível que a proliferação celular mediada pela gastrina também contribua para o aceleração da cicatrização gástrica promovido pela fração SE-AE. Adicionalmente, é sabido que a expressão de fatores que promovem a proliferação celular como EGF, TFG α e HGF é aumentada durante o período inicial de cicatrização da úlcera, e que aumento dos níveis séricos de gastrina nessa fase possa ser decorrente pela notável supressão ácida promovida por tais fatores (KONTUREK *et al.*, 1992). Além do mais, os níveis de gastrina e a expressão desses fatores decaem com a progressão da cicatrização da lesão (KONTUREK *et al.*, 1992). Assim é provável, mas ainda não provado, que o aumento da gastrinemia promovido pela fração SE-AE em animais ulcerados seja decorrente da participação desses fatores de crescimento em seu efeito cicatrizante gástrico.

À luz dos dados até aqui discutidos, a atividade gastroprotetora e cicatrizante gástrica da fração SE-AE foi evidente e possivelmente mediada pelo favorecimento de fatores protetores da mucosa gástrica, em especial as defesas antioxidantes e as PGs. Além disso, doses reduzidas da fração foram requeridas para todos os efeitos descritos. Diante disso, nos interessou explorar ainda mais os efeitos da fração.

Como já descrito anteriormente, a fração SE-AE é rica em um isômero de ácido dicafeoilquínico, o composto 1,3 DCQA. Os ácidos dicafeoilquínicos são um grupo de ácidos clorogênicos formados pela esterificação dos ácidos cafeico e quínico (De MARIA e MOREIRA, 2004). Além da clássica atividade antioxidante descrita para tais compostos (XU *et al.*, 2012; GASIC *et al.*, 2014;), o efeito terapêutico em complicações associadas ao diabetes através da inibição da formação dos produtos finais da glicação avançada (AGEs)

(GUGLIUCCI *et al.*, 2009) tem sido descrito para esses compostos. Assim, a atividade anti-glicação da fração SE-AE foi avaliada e, de forma interessante, a fração preveniu a formação *in vitro* de AGEs. Os AGEs constituem uma classe de moléculas heterogêneas formadas a partir de reações aminocarbonilo não-enzimáticas, que ocorrem aceleradamente no estado hiperglicêmico do diabetes. Uma vez que esses compostos são capazes de modificar irreversivelmente as propriedades químicas e funcionais de diversas estruturas biológicas, eles têm fundamental importância nas complicações orgânicas desencadeadas pelo diabetes, tais como a retinopatia (STITT e CURTIS, 2005), a neuropatia (JACK e WRIGHT, 2012) e complicações cardiovasculares (PIARULLI *et al.*, 2013). Além do dano promovido aos componentes celulares através da formação dos AGEs, esses compostos também podem interagir com receptores específicos, os receptores de AGEs (RAGEs) e desencadear uma cascata de eventos intracelulares envolvidos em diversas doenças, em especial as cardiovasculares (YAMAGISHI *et al.*, 2012). Assim, além do estresse oxidativo, os AGEs também são um fator primordial nos danos teciduais causados pelo diabetes (SINGH, 2001). A contribuição dos AGEs nas complicações do trato gastrointestinal associados ao diabetes já foi descrita, incluindo o prejuízo da cicatrização de úlceras gástricas (NAITO *et al.*, 2009) e a neuropatia autônoma presente na gastroparesia diabética (DUBY *et al.*, 2004). Dada a importância da produção de AGEs também nas complicações gastrointestinais associadas ao diabetes e diante da atividade cicatrizante gástrica em animais normais e o efeito anti-glicação, ainda que *in vitro*, da fração em estudo, nós também avaliamos os efeitos dessa fração tanto na cicatrização de úlceras crônicas induzidas por ácido acético em condições hiperglicêmicas e na gastroparesia desenvolvida em ratas diabéticas.

Apesar da prevalência mundial do diabetes mellitus (DM) estar aumentando ao longo dos anos, pouca atenção tem sido dada para a incidência e taxa de cura das úlceras gástricas em diabéticos (BRZOZOWSKA *et al.*, 2004). A alta prevalência em doenças que acometem o trato gastrointestinal entre pacientes diabéticos, tais como a esofagite, o esôfago de Barret, a úlcera péptica e o câncer gástrico já foi descrita (TSENG *et al.*, 2012) e estudos pré-clínicos indicam que o DM aumenta a susceptibilidade da mucosa gástrica à estímulos ulcerogênicos e predispõe ao prejuízo na cicatrização desse tecido (TASHIMA *et al.*, 2000). Por tais razões, as úlceras gástricas que ocorrem no decurso do diabetes são muitas vezes associadas a complicações como a hemorragia gastrointestinal (PIETZSCH *et al.*, 2002; BOEHME *et al.*, 2007).

A estreptozotocina (STZ) é amplamente utilizada para induzir diabetes experimental em animais. Sua ação citotóxica nas células β pancreáticas, produtoras de insulina, é mediada por EROs, visto que a captação da STZ nessas células, através dos transportadores de glicose do tipo 2 (GLUT-2), causa a ativação de poli ADP-ribosilação, a qual promove a formação intracelular de radicais superóxidos (SZKUDELSKI, 2001). Assim, é fácil prever que o diabetes induzido por STZ é consequência da insulinopenia causada pela destruição das células β .

Comprovando o prejuízo da cicatrização gástrica em decorrência do diabetes, em nossos experimentos foi observado que a área das úlceras gástricas induzidas por ácido acético foi maior nos animais diabéticos em relação aos normoglicêmicos e que a dose da fração SE-AE efetiva em acelerar a cicatrização gástrica em condições normais de glicemia foi ineficaz na cicatrização gástrica em condições hiperglicêmicas. No entanto, o tratamento com a fração SE-AE, durante sete dias, na dose de 10 mg/kg, dez vezes maior que a efetiva em animais normoglicêmicos, acelerou a cicatrização das lesões gástricas induzidas por ácido acético em ratas diabéticas. Uma vez que o diabetes mellitus reduz o esvaziamento gástrico (CAMILLERI *et al.*, 2011) e que a taxa de esvaziamento gástrico influencia na absorção e consequentemente na biodisponibilidade de fármacos (DOSTALEK *et al.*, 2012), é provável, porém não provado, que fenômenos farmacocinéticos como o prejuízo na absorção da fração SE-AE explique a necessidade de uma dose dez vezes maior que a efetiva em animais normoglicêmicos para o efeito cicatrizante gástrico em ratas diabéticas.

Apesar do tratamento com omeprazol também ter reduzido a extensão das lesões gástricas induzidas por ácido acético em ratas diabéticas, esse tratamento não reduziu as lesões nesses animais em comparação ao grupo normoglicêmico tratado com veículo. Somente o tratamento com a fração SE-AE reduziu as lesões gástricas induzidas por ácido acético em ratas diabéticas mesmo em relação ao grupo normoglicêmico tratado com veículo. Como exposto por BASTAKI e colaboradores (2010) o diabetes promove alterações funcionais e morfológicas nas células parietais, reduzindo a atividade da H^+/K^+ -ATPase e a secreção gástrica basal em ratos diabéticos. Desta forma, a menor eficácia do tratamento com omeprazol em condições hiperglicêmicas, pode ser explicada por tais alterações e indica que a acidez da secreção gástrica não é o fator primordial para o prejuízo cicatricial da mucosa. Apesar do exposto, a terapia atual para o tratamento de úlceras gástricas em pacientes diabéticos ainda é baseada na supressão ácida por antagonistas de receptores H_2 e IBPs.

Assim, abordagens terapêuticas que independam da supressão ácida, tal como os mecanismos envolvidos nos efeitos da fração SE-AE, podem tornar-se relevantes no tratamento úlceras gástricas nesses pacientes. Além do mais, a utilização de inibidores de bomba de prótons por pacientes diabéticos está relacionada ao prejuízo do esvaziamento gástrico de sólidos nesses pacientes (SANAKA *et al.*, 2010) o que pode agravar ainda mais uma gastroparesia já existente.

O potencial gastroprotetor do ácido ascórbico já foi demonstrado por alguns estudos. Assim, a administração oral do antioxidante na dose de 100 a 400 mg/kg promoveu gastroproteção contra indometacina (KOC *et al.*, 2008) e na dose de 500 mg/kg contra o etanol (POTRICH *et al.*, 2010). Mais recentemente, OWU e colaboradores (2012) também demonstraram o efeito gastroprotetor do ácido ascórbico (200 mg/kg) em úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos diabéticos. Por outro lado, em nossos experimentos o tratamento oral com ácido ascórbico (300 mg/kg), durante sete dias, não foi efetivo em acelerar a cicatrização das lesões gástricas em ratas diabéticas. Esse resultado é corroborado por estudos anteriores de nosso grupo, nos quais a ineficácia do tratamento oral com ácido ascórbico (250 e 300 mg/kg) em acelerar a cicatrização das lesões gástricas induzidas por ácido acético em animais normais foi demonstrada (POTRICH *et al.*, 2010; DA SILVA *et al.*, 2013). É sabido que além da hiperglicemia aumentar a geração das espécies reativas de oxigênio, também produz danos teciduais pela ativação da proteína quinase C ou pelo aumento do metabolismo da via dos polióis (WILLIAMSON *et al.*, 1993) , ou ainda, como descrito anteriormente, pela formação dos produtos da glicação avançada. Assim, a ineficácia do tratamento com ácido ascórbico indica que além do estresse oxidativo outros eventos precisam ser descontinuados para o restabelecimento da homeostasia do tecido gástrico.

MOHAN e colaboradores (2006) reportaram que além do aumento do estresse oxidativo, a diminuição de fatores protetores da mucosa gástrica também está entre os mecanismos multifatoriais envolvidos de forma pronunciada no prejuízo da cicatrização das úlceras gástricas em ratos diabéticos. Realmente, em nossos experimentos os níveis de EROs intracelulares mensurados pela DCFH-DA foram mais intensamente reduzidos e aumentados, respectivamente, no tecido ulcerado de ratas diabéticas. Porém, o aumento dos níveis da atividade da MPO e a depleção das mucinas e do GSH foram de intensidade semelhantes na lesão gástrica induzida em ratas normoglicêmicas e diabéticas. Por outro lado, o tratamento com a fração SE-AE aumentou a marcação para mucina, reduziu os níveis de EROs, restaurou

os níveis da atividade da MPO e parcialmente o conteúdo de GSH na mucosa gástrica de ratas diabéticas expostas ao ácido acético. Desta forma, a participação do aumento de fatores protetores da mucosa, incluindo o aumento de muco protetor e mecanismos antioxidantes também são evidentes no efeito cicatrizante gástrico da fração SE-AE em condições hiperglicêmicas.

É sabido que durante o diabetes, a hiperglicemia e os prejuízos no metabolismo da glicose promovem acentuado estresse oxidativo, incluindo alterações em enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a GST e a GPx (GONDI *et al.*, 2014). A SOD atua como um sistema de defesa intracelular, degradando o ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (CHANDE e BUDINGER, 2007). A CAT é uma enzima que metaboliza o H_2O_2 em água e oxigênio de maneira extremamente rápida e desta maneira tem um papel importante contra os efeitos tóxicos dos peróxidos (SIRAKI *et al.*, 2002). A GPx é uma segunda via do metabolismo do H_2O_2 que depende da cooperação da GR (KWIECIEN *et al.*, 2002). A GST é uma super família de isoenzimas que catalisam a conjugação de compostos eletrofílicos à GSH, produzindo compostos menos reativos (CNUBBEN *et al.*, 2001). Considerando que tais enzimas também são importantes defesas da mucosa gástrica (BAYIR, 2005), o efeito da fração SE-AE sobre os níveis de suas atividades em ratas diabéticas ulceradas também foi acessado.

Neste estudo verificamos que os níveis de atividade da SOD, da CAT e GPx foram aumentados pela exposição da serosa ao ácido acético. Além disso, esse aumento foi mais pronunciado na mucosa gástrica ulcerada de ratas diabéticas. O aumento nos níveis da atividade da SOD (Da SILVA *et al.*, 2013) e da expressão e atividade da CAT (KONTUREK *et al.*, 2010) já foram descritos na úlcera gástrica induzida por ácido acético e pode ser uma resposta ao aumento de EROs. Corroborando o exposto por MARIA-FERREIRA e colaboradores (2014), a atividade da GST foi reduzida nos tecidos ulcerados e é provável que essa redução seja decorrente da depleção de GSH, uma vez que esta molécula é um importante para reações de conjugação promovidas pela GST. Por outro lado, reforçando ainda mais que o restabelecimento do equilíbrio redox participa dos efeitos cicatrizantes da fração mesmo em condições hiperglicêmicas, os níveis de atividade da SOD, GPx e GST na mucosa gástrica de ratas diabéticas estavam mais próximos aos encontrados nos animais normoglicêmicos não ulcerados.

O efeito hipoglicemiante de compostos isolados da bardana já são conhecidos (XU *et al.*, 2014). Contudo, uma vez que o tratamento com a fração SE-AE não alterou os níveis glicêmicos ou a taxa de hemoglobina glicada em ratas diabéticas, a melhora na cicatrização gástrica nesses animais não foi devido a efeitos hipoglicemiantes de compostos presentes na fração. Desta maneira podemos indicar que sob condições aumentadas de glicemia, o aumento dos fatores protetores da mucosa gástrica também participam da atividade cicatrizante gástrica da fração SE-AE. Além disso, apesar dos níveis gástricos de AGEs em animais diabéticos tratados ou não com a fração SE-AE ainda não terem sido avaliados, é provável que a inibição da glicação de estruturas teciduais da mucosa gástrica também participem dos efeitos da fração na cicatrização gástrica de ratas diabéticas.

De forma mais frequente que o prejuízo na cicatrização da mucosa gástrica, os portadores de DM podem apresentar quadros específicos de distúrbios de motilidade gástrica de grande relevância clínica como a gastroparesia, a qual é caracterizada por uma taxa de esvaziamento gástrico anormal, associada a sintomas como náuseas, vômitos, plenitude pós-prandial, saciedade precoce, e inchaço abdominal (CAMILLERI *et al.*, 2011). A gastroparesia que afeta pacientes com diabetes aumenta a morbidade e mortalidade desses pacientes, principalmente pela ocorrência de prejuízos nutricionais graves e pelo controle glicêmico tornar-se ainda mais difícil (TALLEY *et al.*, 2001).

Em geral o tratamento da gastroparesia diabética é realizado principalmente através da utilização de drogas pró-cinéticas como a metoclopramida, a domperidona e a eritromicina, mas também pode incluir modificações dietéticas e utilização de agentes anti-eméticos (GANGULA *et al.*, 2011). Das alternativas farmacológicas disponíveis, a metoclopramida é o único medicamento aprovado pelo Food and Drug Association (FDA) para o tratamento de gastroparesia nos Estados Unidos, e tem seu efeito pro cinético através do aumento da liberação de acetilcolina no plexo mioentérico, e do antagonismo do receptor D2 de dopamina (BOURAS *et al.*, 2013). Entretanto, apesar de eficaz, o uso de metoclopramida por mais de doze semanas não é recomendado, devido à incidência dos efeitos colaterais que ocorrem principalmente em mulheres e incluem discinesia tardia, hiperprolactinemia, galactorréia e irregularidades menstruais (PARKMAN *et al.*, 2012).

A domperidona também é um antagonista de receptores D2 e tem efeitos anti-eméticos e procinéticos semelhantes à metoclopramida, no entanto não atravessa a barreira hemato-

encefálica (PARKMAN *et al.*, 2011). Os efeitos colaterais relacionados ao seu uso incluem boca seca, dores de cabeça, hiperprolactinemia acompanhada de galactorréia e irregularidades menstruais (CAMILLERI *et al.*, 2013).

A eritromicina é um prócinético agonista dos receptores da motilina, um hormônio endógeno que estimula o esvaziamento gástrico (BOURAS *et al.*, 2013). Apesar de disponível para administração endovenosa e oral, a utilização a longo prazo está associada ao desenvolvimento de taquifilaxia e efeitos colaterais como náuseas, diarreia e desconforto abdominal já foram descritos (LAMIAN *et al.*, 2006).

Por conta dos inconvenientes relacionados à terapia vigente, alternativas terapêuticas no tratamento da gastroparesia, bem como uma melhor compreensão dos eventos etiológicos nos quais o diabetes promove essa complicação são necessários. Considerando o exposto e o potencial terapêutico da fração SE-AE discutido até aqui, este estudo foi ampliado para investigar os efeitos da referida fração no prejuízo da motilidade gástrica espontaneamente desenvolvido em ratas diabéticas.

Para avaliar o efeito do diabetes no esvaziamento gástrico de ratas, uma análise temporal das alterações deste parâmetro foi primeiramente realizada. Assim, após duas semanas da indução do diabetes por STZ foi observado um declínio na taxa de esvaziamento gástrico nas ratas. De forma interessante, animais diabetizados há quatro semanas apresentaram um aumento na taxa de esvaziamento gástrico, como reportado em ratos por MIYAMOTO e colaboradores (2001). Contudo, a avaliação da taxa de esvaziamento gástrico oito semanas após a indução do diabetes demonstrou que o prejuízo neste parâmetro em ratas diabéticas foi novamente restabelecido. Tal variação, em especial o aumento do esvaziamento gástrico quatro semanas após a indução do diabetes já foi descrito em ratos, mas não em ratas, e parece ser relacionado à diminuição dos níveis de peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) no antro e corpo gástrico (MIYAMOTO *et al.*, 2001) e ao aumento dos níveis plasmáticos de grelina (ARIGA *et al.*, 2008).

Frente a esses dados, optou-se pela mensuração da taxa de esvaziamento gástrico em ratas diabéticas ao término da oitava semana da indução do diabetes, e com exceção à insulina, os tratamentos foram iniciados ao final da segunda semana após a indução do diabetes.

Como esperado, as ratas submetidas ao controle da glicemia através da administração diária de insulina, apresentaram níveis normais de esvaziamento gástrico oito semanas após a indução do diabetes, indicando que a manutenção de um estado normoglicêmico é crucial para a prevenção da gastroparesia. Entretanto, apesar de o tratamento crônico com a fração SE-AE, ácido ascórbico ou domperidona não reduzir a glicemia, todos estes tratamentos também restabeleceram os níveis do esvaziamento gástrico de ratas diabéticas para taxas normais, demonstrando que todos os tratamentos foram eficazes em reverter às alterações promovidas pelo diabetes na função motora gástrica. Ademais, vale destacar que agudamente, somente a administração de domperidona, mas não da fração SE-AE, alterou o esvaziamento gástrico tanto em ratas normoglicêmicas como diabéticas e que a administração de ácido ascórbico *per se* já é sabidamente ineficaz em acelerar o esvaziamento gástrico de ratos (SHARMA *et al.*, 2000). Dessa forma, o efeito pró cinético da fração e do ácido ascórbico em ratas diabéticas parece estar relacionado especificamente à regressão gradual dos efeitos deletérios do diabetes na motilidade gástrica. Desta maneira, estudos funcionais foram conduzidos com o intuito de melhor explorar os efeitos pró cinéticos da fração SE-AE e do ácido ascórbico em ratas diabéticas.

O relaxamento e contração do fundo gástrico são cruciais na acomodação e na propulsão do bolo alimentar em direção ao estômago distal (FARRÉ e TACK, 2013). Com a chegada do conteúdo luminal ao estômago distal, a contração adequada do piloro evita a saída precoce do quimo, enquanto que, ao final da digestão gástrica, o relaxamento pilórico é exigido para a entrega do mesmo ao duodeno (READ e HOUGHTON, 1989). Dada a importância dessas regiões, os experimentos funcionais foram conduzidos tanto no esfíncter pilórico, como no fundo gástrico de ratas.

O KCl, um agente despolarizante, é classicamente empregado em estudos funcionais por promover uma resposta contrátil facilmente mensurável. De fato, o emprego de KCl (40 mM) em nossos experimentos contraiu todos os segmentos teciduais analisados. Além disso, a magnitude da resposta contrátil dos tecidos oriundos de ratas normoglicêmicas e diabéticas foi similar. JAMES e colaboradores (2004) também não verificaram diferenças entre a resposta contrátil ao KCl (80 mM) do fundo gástrico de camundongos diabéticos da linhagem C57BLKS/J db/db e camundongos normais. Discordando desses dados, AIHARA e SAKAI (1989), demonstraram o aumento da resposta contrátil ao KCl (60 mM) no fundo gástrico de ratos diabetizados por STZ. É provável que tais diferenças entre os resultados obtidos nestes

estudos podem ser explicadas pela diferença do modelo experimental de diabetes utilizado. Além do mais, apesar do modelo de diabetes experimental utilizado por AIHARA e SAKAI (1989) ter sido o mesmo que o utilizado em nosso estudo, a diferença de gênero entre os animais experimentais avaliados por esses autores e os animais experimentais do nosso estudo também pode influenciar nas diferenças dos dados obtidos entre os dois trabalhos, haja vista que peculiaridades estão presentes nos eventos patogênicos da gastroparesia diabética que acomete o sexo feminino (GANGULA *et al.*, 2007). Curiosamente, o aumento da resposta contrátil ao KCl foi observado nos segmentos teciduais do fundo gástrico de ratas diabéticas tratadas com a fração SE-AE ou ácido ascórbico, e estudos adicionais ainda são requeridos para o melhor compreensão deste efeito.

A hipomotilidade do fundo gástrico tem sido apontada como principal fator para sintomas dispépticos, em especial a saciedade precoce, em pacientes diabéticos (SAMSOM *et al.*, 1998). Em adição, estudos eletrofisiológicos em pacientes diabéticos já evidenciaram o prolongamento da contração pilórica através de disritmias nas ondas contráteis lentas do piloro (JEBBINK *et al.*, 1994). De fato, a hiper-reatividade pilórica e a hipocontratilidade fúndica em resposta a acetilcolina (Ach) também já foram descritas em camundongos diabéticos C57BLKS/J db/db (JAMES *et al.*, 2004). Ademais, a redução da contratilidade do antrum de camundongos *ob/ob* também já foi descrita, e o envolvimento do prejuízo da sinalização de cálcio intracelular foi apontada como causa desse desajuste (BHETWAL, *et al.*, 2013). Reiterando tais achados, a hipocontratilidade fúndica também foi observada em nossos experimentos, evidenciando que o desajuste na coordenação contrátil do estômago é um evento crucial no retardo do esvaziamento gástrico também no diabetes induzido por STZ em ratas.

Como esperado, a manutenção dos níveis glicêmicos em valores normais pelo tratamento com insulina reverteu todas as alterações contráteis à Ach descritas acima. O tratamento com a fração SE-AE reduziu a CE_{50} para Ach no piloro e aumentou a contratilidade fúndica para este neurotransmissor em ratas diabéticas. Similarmente, o tratamento com ácido ascórbico reduziu a resposta máxima para a Ach no piloro e aumentou a contratilidade fúndica. O trato gastrointestinal é fortemente influenciado pelo sistema nervoso autônomo, sendo a Ach o principal neurotransmissor excitatório desse sistema (CELLINI *et al.*, 2011). Além disso, a neuropatia autonômica causada pelo diabetes é bem conhecida e têm sido descrita como a origem de alterações gastrointestinais promovidas pela doença

(GATOPOULOU *et al.*, 2012). Adicionalmente, alterações axonais e ganglionares em fibras aferentes e células gliais do plexo mientérico gástrico evidenciam a participação de neuropatia entérica nos prejuízos gastomotores induzidos pelo diabetes (TAY e WONG, 1994; HONORÉ *et al.*, 2011). Dessa forma é possível que tanto a neuropatia autonômica, como a entérica promovam alterações na síntese e na responsividade tecidual à Ach, ainda que de maneira diferente em cada região gástrica como descrito por CELLINI e colaboradores (2011). O estresse oxidativo tem sido descrito como um fator primordial entre os mecanismos causadores da neuropatia autonômica e entérica induzida pelo diabetes (YILMAZ-OZDEN *et al.*, 2014). À luz dessa informação, é possível que a normalização da resposta contrátil à Ach promovido tanto pelo tratamento com a fração SE-AE, como com ácido ascórbico, no piloro e fundo gástrico de ratas diabéticas possa ser decorrente da atividade antioxidante de ambos. No entanto é preciso ressaltar que a utilização clínica de antioxidantes em pacientes diabéticos ainda não apresentou êxito na prevenção ou melhora da gastroparesia (GOLBIDI *et al.*, 2011), indicando que mais estudos ainda são necessários para otimizar essa abordagem terapêutica. Todavia, apesar das semelhanças nos efeitos do tratamento da fração SE-AE e do ácido ascórbico é preciso evidenciar que a dose efetiva da fração foi 300 vezes menor em relação ao ácido ascórbico, assim é possível inferir que, em adição à ação antioxidante, outros mecanismos ainda possam participar dos efeitos promovidos pela fração. Provavelmente o efeito anti-glicação da fração esteja entre tais mecanismos, uma vez que os níveis de hemoglobina glicada de ratas diabéticas tratadas com a fração SE-AE foram significativamente reduzidos mesmo sob hiperglicemia.

Além das alterações aos estímulos colinérgicos, o prejuízo na sinalização não adrenérgica e não colinérgico (NANC) também já foi demonstrado em animais diabéticos (ZANDECKI *et al.*, 2008). O óxido nítrico, um mediador gasoso, é considerado o principal mecanismo relaxante NANC do trato gastrointestinal (GANGULA, 2011). O relaxamento promovido pelo óxido nítrico é decorrente da estimulação da enzima guanilato ciclase solúvel com conseqüente formação de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) intracelular (LYONS, 1995), e a estimulação de proteína kinase G (PKG), o que resulta na redução das concentrações intracelulares de cálcio (JUNG *et al.*, 1999). O NO é sintetizado a partir da L-arginina através da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que pode ser neuronal (nNOS ou NOS1), induzida (iNOS ou NOS2) e endotelial (eNOS ou NOS3) (WANG e MARDSEN, 1995). O NO liberado através de estímulos do plexo mioentérico gástrico causa o relaxamento

do trato gastrointestinal, incluindo o relaxamento do tônus do esfíncter inferior do esôfago, do piloro, do esfíncter de Oddi e ânus, além de regular a acomodação do fundo e o reflexo peristáltico do intestino (TAKAHASHI, 2003). Em geral, o prejuízo no relaxamento nitrérgico pode ser decorrente de alterações na síntese ou na viabilidade do NO, bem como na inativação da via NO/cGMP/PKG (LUMME *et al.*, 1996; JUNG *et al.*, 1999; CELLEK *et al.*, 2003). Desta forma, inibidores da NOS prejudicam o esvaziamento gástrico e a redução da expressão ou da atividade da NOS1, associada ao prejuízo local da produção de NO, também podem ser responsáveis por desordens de motilidade gástrica (TAKAHASHI, 2003).

O nitroprussiato de sódio (SNP), um doador de óxido nítrico clinicamente utilizado como vasodilatador, também é bastante utilizado em protocolos experimentais onde se objetiva avaliar relaxamento tecidual. Assim, este nitrato orgânico também foi utilizado em nosso estudo para avaliar o prejuízo no relaxamento mediado por NO no tecido gástrico. O prejuízo no relaxamento promovido pelo SNP foi constatado no piloro, mas não no fundo gástrico, de ratas diabéticas. A semelhança entre a intensidade do relaxamento promovido pelo SNP no fundo gástrico de ratas diabéticas e normoglicêmicas já foi descrito por TAKAHASHI e colaboradores (1997) e sugere que o prejuízo no relaxamento fúndico induzido pelo diabetes não está relacionado a alterações nos eventos intracelulares desencadeados pelo NO e sim pela redução de sua síntese ou disponibilidade tecidual durante o diabetes. Contudo, no piloro, frente aos resultados obtidos, é provável que alterações na sinalização nitrérgica intracelular também ocorram. Além do mais, uma vez que a intensificação de mecanismos excitatórios pode contribuir para a disfunção nitrérgica (CELLEK *et al.*, 2000), é provável que a hiper-reatividade pilórica, representada neste estudo pelo aumento da resposta contrátil à Ach, participe da redução do relaxamento evocado por SNP no piloro de ratas diabéticas.

Em relação aos efeitos dos tratamentos no relaxamento tecidual evocado por SNP, ratas diabéticas tratados com a fração SE-AE, mas não com ácido ascórbico, exibiram relaxamento pilórico em intensidade semelhante ao relaxamento produzido no piloro de ratas normoglicêmicas. Assim, apesar do estresse oxidativo promover a inativação da via NO/cGMP/PKG (JUNG *et al.*, 1999), a ineficácia do tratamento com ácido ascórbico neste parâmetro reforça que mecanismos aditivos à atividade antioxidante participam dos efeitos da fração SE-AE no restabelecimento da função motora gástrica em condições hiperglicêmicas.

Embora o relaxamento do fundo gástrico evocado pelo SNP não esteja alterado em condições hiperglicêmicas, alguns trabalhos sugerem que o prejuízo no relaxamento fúndico induzido pelo diabetes está associado à redução da síntese ou disponibilidade tecidual de NO em virtude do estresse oxidativo desencadeado pelo diabetes (GANGULA *et al.*, 2007; 2010a; 2010b e 2011). Desta forma, o prejuízo no relaxamento nitrérgico do fundo gástrico de ratas diabéticas foi novamente investigado. Entretanto, ao invés de promover o relaxamento através de um doador de NO como o SNP, neste experimento nós utilizamos a estimulação elétrica de campo (EEC) sob condições NANC. Sob condições NANC, a aplicação de um estímulo elétrico sobre segmentos do fundo gástrico promove relaxamento principalmente mediado pelo NO (GANGULA *et al.*, 2007) e sensível a tetrodotoxina, indicando a origem neuronal do mediador gasoso. Como esperado, nesses experimentos o relaxamento do fundo gástrico de ratas diabéticas foi reduzido em relação ao obtido em ratas normoglicêmicas e a participação do NO foi atestada pela redução desta resposta após a incubação das preparações teciduais com L-NAME, um inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase. A viabilidade do NO, assim como sua habilidade em ativar GCs, são prejudicadas com o aumento de EROs (LUMME *et al.*, 1996). Em vigência do pronunciado estresse oxidativo nos tecidos gástricos de animais diabéticos (YILMAZ-OZDEN *et al.*, 2014), a participação deste fator no prejuízo do relaxamento NANC do fundo gástrico destes animais é plausível. Em contrapartida, o tratamento com a fração SE-AE e com ácido ascórbico restabeleceu os níveis do relaxamento NANC no fundo gástrico de ratas diabéticas. Tal efeito indica à capacidade de ambos os tratamentos em preservar a síntese e/ou a viabilidade do NO nos fundo gástrico, possivelmente através da redução de EROs.

No sistema nervoso entérico, a síntese de NO é promovida pela atividade da enzima nNOS, expressa em neurônios inibitórios desse sistema (TAKAHASHI *et al.*, 2003). Sobre os níveis de expressão desta enzima no tecido gástrico de animais diabéticos, alguns autores já demonstraram a redução no corpo gástrico de ratos espontaneamente diabéticos (BB/W) (TAKAHASHI *et al.*, 1997) e outros o aumento no antro do estômago de ratos, mas não de ratas, diabetizados por STZ (GANGULA *et al.*, 2007). Além disso, já foi descrito que embora ratas diabetizadas por STZ não apresentem alterações nos níveis de expressão da nNOS, a dimerização e atividade do subtipo nNOS α são reduzidas (GANGULA *et al.*, 2007). Em nossos resultados pudemos constatar o aumento nos níveis da expressão desta enzima nas amostras teciduais oriundas de ratas diabéticas tratadas com veículo. Além disso, outro dado interessante também foi o aumento do número de neurônios NADPH-diaforase positivos

nesses animais. Os neurônios NADPH-diaforase positivos são neurônios produtores de NO (HOPE *et al.*, 1991). Vários autores já descreveram o envolvimento de alterações nitrérgicas entre os distúrbios no sistema nervoso entérico promovidos pela neuropatia entérica diabética (TAKAHASHI *et al.*, 2003; CELLEK *et al.*, 2004), em especial a redução da atividade e o prejuízo da produção local de NO (GANGULA *et al.*, 2010). Assim, embora não tenhamos mensurado os níveis de NO através da quantificação de nitrito e nitrato nos tecidos gástricos de ratas diabéticas, o prejuízo do relaxamento NANC promovido pela EEC no fundo gástrico de ratas diabéticas suportam a hipótese de que tanto o aumento dos níveis de expressão da NOS1 como o aumento no número de neurônios entéricos positivos para a NADPH-diaforase podem ser uma resposta à deficiência da produção e/ou viabilidade do NO nos tecidos gástricos, em uma tentativa de aumentar a disponibilidade de NO tecidual. Contudo, tanto o tratamento com insulina, como com a fração SE-AE ou ácido ascórbico preveniram tais alterações, indicando a preservação da produção e disponibilidade de NO nos tecidos gástricos. Em conjunto, esses últimos dados e o relaxamento nitrérgico normal evidenciado nos experimentos funcionais, indicam que a síntese e a viabilidade do NO estão entre os efeitos da fração SE-AE para a manutenção da função motora gástrica e mais uma vez esse efeito pode ser decorrente da atividade antioxidante da fração, dado que tanto a síntese, a viabilidade ou os mecanismos intracelulares desencadeados pelo NO são sensíveis as espécies reativas de oxigênio.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que:

- ✓ O extrato SE ($DE_{50} = 3,8$ mg/kg), a fração SE-AE (0,15 mg/kg) e o ácido 1,3-O-dicafeoilquínico (57 μ g/kg, v.o) apresentaram gastroproteção mediada por fatores protetores da mucosa gástrica como as defesas antioxidantes e as PGs.
- ✓ A fração SE-AE (1 mg/kg, v.o) acelerou a cicatrização de úlceras induzidas por ácido acético 80% em ratas, através do aumento do conteúdo de mucina gástrica, GSH e gastrina sérica, e a redução da atividade da mieloperoxidase (MPO) e do conteúdo de espécies reativas de oxigênio (EROs);
- ✓ Apesar de o tratamento vigente para as úlceras gástricas ser realizado através de fármacos antissecretores, a fração SE-AE não apresentou qualquer atividade antissecretora;
- ✓ Uma vez que as complicações associadas ao diabetes estão relacionadas com o estresse oxidativo e a formação de AGEs, a atividade sequestradora do radical DPPH e anti-glicação protéica, ainda que *in vitro*, da fração SE-AE, indicam o potencial promissor da fração no tratamento de complicações associadas ao diabetes;
- ✓ A fração SE-AE (10 mg/kg, v.o) também acelerou a cicatrização de úlceras induzidas por ácido acético 80% em ratas diabéticas, através do aumento do conteúdo de mucina e GSH, da redução da atividade MPO e do conteúdo de EROs e da restauração da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione-S-transferase (GST) e glutathione peroxidase (GPx);
- ✓ A fração SE-AE (1 mg/kg, v.o) reduziu os níveis de hemoglobina glicada, restabeleceu o esvaziamento gástrico de ratas diabéticas através da normalização da contração colinérgica e do relaxamento nitrérgico do fundo e do piloro;

- ✓ A manutenção dos níveis normais de expressão da enzima NOS-1 e da quantidade de neurônios entéricos NADPH-diaforase positivos no corpo gástrico de ratas diabéticas tratadas com a fração SE-AE indicaram que a síntese e a viabilidade do NO estão preservadas nesses animais;

Em conjunto, nossos dados demonstram o efeito gastroprotetor e cicatrizante gástrico da fração SE-AE das folhas da bardana associado com o aumento de fatores protetores da mucosa gástrica, como a manutenção do muco gástrico, a redução da infiltração de neutrófilos e o favorecimento de defesas antioxidantes. Além disso, sob condições hiperglicêmicas é possível que a modulação das defesas antioxidantes e o potencial anti-glicação da fração também colaborem para sua atividade cicatrizante gástrica e para o restabelecimento da função motora gástrica de ratas diabéticas. Ademais, além do restabelecimento da resposta contrátil, a restauração do relaxamento nitrérgico de tecidos gástricos e a preservação da síntese e/ou viabilidade do óxido nítrico também estão relacionados com a atividade pro cinética da fração em ratas diabéticas. Entretanto, mais estudos são necessários para elucidar mais profundamente estes mecanismos e ainda outros envolvidos tanto na proteção gástrica promovida pela fração SE-AE em ratas normais e diabéticas, como no restabelecimento do esvaziamento gástrico sob condições hiperglicêmicas.

7. BIBLIOGRAFIA

ABELL, T.L.; BERNSTEIN, R.K.; CUTTS, T.; FARRUGIA, G.; FORSTER, J.; HASLER, W.L.; MCCALLUM, R.W.; OLDEN, K.W.; PARKMAN, H.P.; PARRISH, C.R.; PASRICHA, P.J.; PRATHER, C.M.; SOFFER, E.E.; TWILLMAN, R.; VINIK, A.I. Treatment of gastroparesis: a multidisciplinary clinical review. **Neurogastroenterol Motil.**, v. 18, n.4, p. 263-283, 2006

ABITOL, R. A. **Doença ulcerosa péptica**. Medstudents: Rotinas de Clínica Médica. Disponível em: <http://www.medstudents.com.br/rotinas/clinmed/dup.htm>. Acesso em: 17/08/09.

ADLER, A.I.; STRATTON, I.M.; NEIL, H.A.; YUDKIN, J.S.; MATTHEWS, D.R.; CULL, C.A.; WRIGHT, A.D.; TURNER, R.C; HOLMAN, R.R. Association of systolic blood pressure with macrovascular and microvascular complications of type 2 **diabetes** (UKPDS 36): prospective observational study.**BMJ.**, v. 321, n.7258, p. 412-419, 2000.

AEBI, H.Catalase. **Methods Enzymol**, v.105, p. 121–126, 1984

AIHARA, K.; SAKAI, Y. Hyperreactivity of contractile response in gastric fundus smooth muscle from rats with diabetes induced by streptozotocin.*Arch Int Pharmacodyn Ther.*, v. 302, p.220-231, 1989.

ALLEN, A; FLEMSTRÖM, G; GARNER, A; KIVILAAKSO, E .Gastroduodenal mucosal protection. **Physiological Reviews**, v. 73, p. 823-857, 1993.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.*, v. 37, p. S81-90, 2014.

ANDRIULLI, A.; MANGIA, A.; LAWSON, F. Antisecretory drugs, hypergastrinemia and hyperplasia of enterochromaffin-like cells (ECL). **Minerva Gastroenterol Dietol.**, v. 37, n. 3, p. 135-140, 1991.

ANSON, M.L. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. **J Gen Physiol.** v. 22, n.1, p. 79-89, 1938.

ARAKAWA, T.; WATANABE, T.; TANIGAWA, T.; TOMINAGA, K.; FUJIWARA, Y.; MORIMOTO, K. Quality of ulcer healing in gastrointestinal tract: its pathophysiology and clinical relevance. **World J Gastroenterol.**, v. 18, n.35, p. 4811-4822, 2012.

ARAÚJO, L.M.; BRITO, M.M.; CRUZ, T.R. Tratamento do diabetes mellitus do tipo 2: novas opções. **Arq Bras Endocrinol Metab.**,v. 44, p.509-518, 2000

ARIGA, H.; IMAI, K.; CHEN, C.; MANTYH, C.; PAPPAS, T.N.; TAKAHASHI, T. Does ghrelin explain accelerated gastric emptying in the early stages of diabetes mellitus?*Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, v. 294, n. 6, p. R1807-R1812, 2008.

ARNHOLD, J. Furtmüller PG, Obinger C. Redox properties of myeloperoxidase. *Redox Rep.*, v.8, n.4, p. 179-186, 2003.

ATAY, S.; TARNAWSKI, A.S.; DUBOIS, A. Eicosanoids and stomach. **Prostaglandins & Others Lipids Mediators**. v.61, n.3-4, p.105-124, 2000.

BASTAKI, S.M.; ADEGHATE, E.; CHANDRANATH, I.S.; AMIR, N.; TARIQ, S.; HAMEED, R.S.; ADEM, A. Effects of streptozotocin-induced long-term diabetes on parietal cell function and morphology in rats. **Mol Cell Biochem.**, v. 341, n. 1-2, p. 43-50, 2010.

BARAKA, A.M.; GUAMEI, A.; GAWAD, H.A. Role of modulation of vascular endothelial growth factor and tumor necrosis factor- α in gastric ulcer healing in diabetic rats. **Biochem Pharmacol.**, v.79, n.11, p. 1634-1639, 2010.

BARNETT J.L.; OWYANG, C. Serum glucose concentration as a modulator of interdigestive gastric motility. **Gastroenterology.**, v.94, n.3, p. 739-744, 1998.

BARROS, D. Fitomedicamentos na indústria brasileira. **Phytomédica**, ano 1, v.1, 2006. Disponível no endereço: www.ache.com.br/arquivo/institucional/phytomedica_jornal/numero5.pdf Acesso em 17/08/09

BARROS, S.B.M.; DAVINO, S.C. Avaliação da Toxicidade. In: OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2003, p.57-67.

BAYR, H. Reactive oxygen species. **Crit Care Med.**, v.33, n.12, p.498-501, 2005.

BERNE, R.M.; LEVY, M.N.; KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A. **Fisiologia**: 5ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

BERSTAD, A.E.; BERSTAD, K.; BERSTAD, A. PH-activated phospholipase A2: an important mucosal barrier breaker in peptic ulcer disease. **Scand J Gastroenterol.**, v. 37, n.6, p.738-742, 2002.

BHETWAL, B.P.; NA, C.; BAKER, S.A.; LYON, K.L.; PERRINO, B.A. Impaired contractile responses and altered expression and phosphorylation of Ca(2+) sensitization proteins in gastric antrum smooth muscles from ob/ob mice. **J Muscle Res Cell Motil.**, v. 34, n. 2, p. 137-149, 2013.

BLOIS, M.S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. **Nature**, v. 181, p. 1199 – 1200, 1958.

BOEHME, M.W.; AUTSCHBACH, F.; ELL, C.; RAETH, U. Prevalence of silent gastric ulcer, erosions or severe acute gastritis in patients with type 2 diabetes mellitus--a cross-sectional study. **Hepatogastroenterology.**, v .54, n.74, p. 643-648, 2007.

BORG, J.; MELANDER, O.; JOHANSSON, L.; UVNÄS-MOBERG, K.; REHFELD, J.F.; OHLSSON, B. Gastroparesis is associated with oxytocin deficiency, oesophageal dysmotility with hyperCCKemia, and autonomic neuropathy with hypergastrinemia. **BMC Gastroenterol.**, v. 25, n. 9, p.17, 2009.

BOURAS, E.P.; VAZQUEZ ROQUE, M.I.; ARANDA-MICHEL, J. Gastroparesis: from concepts to management. *Nutr Clin Pract.*, v. 28, n.4, p. 437-447, 2013.

BRADLEY, P.P.; PRIEBAT, D.A.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal Investigative of Dermatology.**, v.78, p. 206-209, 1982.

BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 11^a Edição. United States of America: Mc Graw-Hill Companies, Inc., 2006.

BRZOZOWSKA, I.; TARGOSZ, A.; SLIWOWSKI, Z.; KWIECIEN, S.; DROZDOWICZ, D.; PAJDO, R.; KONTUREK, P.C.; BRZOZOWSKI, T.; PAWLIK, M.; KONTUREK, S.J.; PAWLIK, W.W.; HAHN, E.G. Healing of chronic gastric ulcers in diabetic rats treated with native aspirin, nitric oxide (NO)-derivative of aspirin and cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor. **J Physiol Pharmacol.**, v. 55, n.4, p. 773-790, 2004.

BRZOZOWSKI, T. Experimental production of peptic ulcer, gastric damage and câncer models and their use in pathophysiological studies and pharmacological treatment – polish achievements. **Journal of physiology and pharmacology**. v.54., p.99-126, 2003.

BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, P.C.; KONTUREK, S.J.; PAJDO, R.; DROZDOWICZ, D.; KWIECIEN, S.; HAHN, E.G. Acceleration of ulcer healing by cholecystokinin (CCK): role of CCK-A receptors, somatostatin, nitric oxide and sensory nerves. **Regul Pept.**, v.82, n.1-3, p. 19-33, 1999.

BURLANDO, B; VEROTTA, L.; CORNARA, L.; BOTTINI-MASSA, E. **Herbal Principles in Cosmetics**. United States of America: Taylor e Francis Group, 2010.

BYTZER, P.; TALLEY, N.J.; LEEMON, M.; YOUNG, L.J.; JONES, M.P.; HOROWITZ, M. Prevalence of gastrointestinal symptoms associated with diabetes mellitus: a population-based survey of 15,000 adults. **Arch Intern Med.**, v.161, n.16, p. 1989-1996, 2001.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Cienc. Cult.**, v.55, n.3, p.37-39, 2003.

CALIXTO, J.B. Estudo farmacológico pré-clínico de plantas medicinais. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. 1 ed. Chapecó: Argos, 2001.

CALVET, X.; VERGARA, M.; BRULLET, E. Endoscopic **treatment** of bleeding ulcers: has everything been said and done?. **Gastroenterol Hepatol.**, v. 28, n.6, p. 347-353, 2005.

CAMILLERI, M. Integrated upper gastrointestinal response to food intake. **Gastroenterology.**, v. 131, n.2, p. 640-658, 2006.

CAMILLERI, M.; BHARUCHA, A.E.; FARRUGIA, G. Epidemiology, mechanisms, and management of diabetic gastroparesis. **Clin Gastroenterol Hepatol.**, v. 9, n.1, p. 5-12, 2011.

CAMILLERI, M.; PARKMAN, H.P.; SHAFI, M.A.; ABELL, T.L.; GERSON, L. American College of Gastroenterology. Clinical guideline: management of gastroparesis. **Am J Gastroenterol.** v. 108, n.1, p. 18-37, 2013.

CARLOTTO, J. Estudo químico e biológico de folhas de *Arctium lappa* L. 106 f. Dissertação (mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

CASTRO, J.L. **Medicina Vegetal**, 2 ed. Publicações Europa-América, 1981, p. 134-135.

CELLEK, S.; FOXWELL, N.A. Moncada S. Two phases of nitrenergic neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. **Diabetes.** , v. 52, n.9, p.2353-2362, 2003.

CELLINI, J.; DINOVO, K.; HARLOW, J.; LEPARD, K.J. Regional differences in neostigmine-induced contraction and relaxation of stomach from diabetic guinea pig. **Auton Neurosci.**, v. 160, n.1-2, p. 69-81, 2011.

CESARINI, P.R.; FERREIRA, S.R.; DIB, S.A. Gastroparesia diabética. **Rev Assoc Med Brasil.**, v. 43, p. 163-168, 1997.

CHAN, Y. S.; CHENG, L. N.; WU, E. C.; KWAN, Y. W.; LEE, S. M. Y.; LEUNG, G. P. H.; YU, P. H. F.; CHAN, S. W. A review of the pharmacological effects of *Arctium lappa* (burdock). **Inflammopharmacology**, v.19, p. 245-254, 2011.

CHANDE, N.S.L.; BUDINGER, G.R.S. Therapeutic potential of superoxide dismutase (SOD) for resolution of inflammation. **Free Radical Biology & Medicine**, v.42, p. 165-174, 2007.

CHANG, F.Y.; CHEN, T.S.; LEE, S.D.; DOONG, M.L.; YEH, G.H.; WANG, P.S. Pentagastrin-induced gastric acid secretion in the diabetic rats: role of insulin. **Chin J Physiol.**, v. 47, n.4, p. 175-181, 2004.

CHEN, F. A.; WU, A. B.; CHEN, C. Y. The influence of treatments on the free radical scavenging activity of burdock and variations of its active. **Food Chemistry**, v. 86, p. 479-484, 2004.

CHIANG, L.C.; CHIANG, W.; CHANG, M.Y.; NG, L.T.; LIN, C.C. Antiviral activity of *Plantago major* extracts and related compounds in vitro. **Antiviral Res.** , v. 55, n.1, p. 53-62, 2002.

CHO, J.Y.; KIM, A.R.; YOO, E.S.; BAIK, K.U.; PARK, M.H. Immunomodulatory effect of arctigenin, a lignan compound, on tumour necrosis factor-alpha and nitric oxide production, and lymphocyte proliferation. **J Pharm Pharmacol.**, v.51, n.11, p.1267-1273, 1999.

CHOI, K.M.; GIBBONS, S.J.; NGUYEN, T.V.; STOLTZ, G.J.; LURKEN, M.S.; ORDOG, T.; SZURSZEWSKI, J.H.; FARRUGIA, G. Heme oxygenase-1 protects interstitial cells of Cajal from oxidative stress and reverses diabetic gastroparesis. **Gastroenterology.**, v. 135, n.6, p. 2055-64, 2004.e1-2, 2008.

CHOUNG, R.S.; LOCKE, G.R. 3RD.; SCHLECK, C.D.; ZINSMEISTER, A.R.; MELTON, L.J. 3RD.; TALLEY, N.J. Risk of gastroparesis in subjects with type 1 and 2 diabetes in the general population. **Am J Gastroenterol.**, v. 107, n.1, p.82-88, 2012.

CNUBBEN, N. H. P., RIETJENS, I. M. C. M., WORTELBOER, H., van ZANDEN, J.& van BLADEREN, P. J. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. **Environmental Toxicology and Pharmacology.**, v.10, p.141-152, 2001.

CORNNER, S.J., MORRISSEY, S.M., WOODS, R.J. 1974. Proceedings: A method for the quantitative estimation of gastric barrier mucus. **J. Physiol.**, v.242, p.116-117.

CORRÊA JÚNIOR, C.; SCHEFFER, M. C. Produção de plantas medicinais, condimentares e aromáticas no Estado do Paraná. In: CORREA JR, C.; GRAÇA, L.R.; SCHEFFER, M.C. **Complexo Agroindustrial das Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares no Estado do Paraná – Diagnóstico e Perspectiva**. 1 ed. Curitiba: EMATER, 2004.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis no Brasil**. Ministério da Agricultura: Instituto de Desenvolvimento Florestal, v.1, p. 269, 1984.

CUNHA, A.P.; SILVA, A.P.; ROQUE, O.R. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**. 1 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gublenkian, 2003.

DARTORA, N. Avaliação dos polissacarídeos e metabólitos secundários das folhas de erva-mate (*Ilex Paraguariensis*) em diferentes estados fisiológicos e de processamento. 109 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011

DA SILVA, L.M, ALLEMAND, A., MENDES, D.A.G.B., DOS SANTOS, A.C., ANDRÉ, E, DE SOUZA, L.M., CIPRIANI, T.R., DARTORA, N., MARQUES, M.C.A, BAGGIO, H.C., WERNER, M.F. Ethanolic extract of roots from *Arctium lappa* L. accelerates the healing of acetic acid-induced gastric ulcer in rats: Involvement of the antioxidant system. **Food and Chemical Toxicology**, v.51, p.179-187, 2013.

DAVIDSON, M. B. **Diabetes mellitus: diagnóstico e tratamento**. Rio de Janeiro: Revinter, 2001. p. 277-303.

DE ALMEIDA, A.B.; SÁNCHEZ-HIDALGO, M.; MARTÍN, A.R.; LUIZ-FERREIRA, A.; TRIGO, J.R.; VILEGAS, W.; DOS SANTOS, L.C.; SOUZA-BRITO, A.R.; DE LA LASTRA, C.A. Anti-inflammatory intestinal activity of *Arctium lappa* L. (Asteraceae) in TNBS colitis model. **J Ethnopharmacol.**, v. 146, n.1, p.300-310, 2013.

DEEKS, E.D. Fixed-dose ibuprofen/famotidine: a review of its use to reduce the risk of gastric and duodenal ulcers in patients requiring NSAID therapy. **Clin Drug Investig.**, v. 33, n.9, p. 689-697, 2013.

DE MARIA, C.A.B.; MOREIRA, R.F.A. Métodos para análise de ácido clorogênico. **Quim. Nova.**, v. 27, n. 4, p. 586-592, 2004.

DIAS, A.S.; LLESUY, S.; MARRONI, C.A.; MARRONI, N. Gastrointestinal alterations in diabetes mellitus: oxidative stress and blood flow in the superior mesenteric artery--experimental study. **Arq Gastroenterol.**, v. 41, n.2, p.108-113, 2004.

DIAS, P.C.; FOGLIO, M.A.; POSSENTI, A.; NOGUEIRA, D.C.; DE CARVALHO, J.E. Antiulcerogenic activity of crude ethanol extract and some fractions obtained from aerial parts of *Artemisia annua* L. **Phytother Res.**, v.15, n.8, p. 670-675, 2001.

DOMER, F.R. **Animail experiments in pharmacological analysis**. Charles C. Thomas Publisher, p. 669, 1971.

DONG, M.H.; KAUNITZ, J.D. Gastroduodenal mucosal defense. **Current Opinion in Gastroenterology**.v.22., n.6, p.599-606,2006.

DOS SANTOS, A.C; BAGGIO, C.H.; FREITAS, C.S.; LEPIESZYNSKI, J.; MAYER, B.; TWARDOWSCHY, A.; MISSAU, F.C.; DOS SANTOS, E.P.; PIZZOLATTI, M.G.; MARQUES, M.C. Gastroprotective activity of the chloroform extract of the roots from *Arctium lappa* L. **J Ethnopharmacol.** v.21, p. 318-23, 2009.

DOSTALEK, M.; AKHLAGHI, F.; PUZANOVOVA, M. Effect of **diabetes mellitus** on pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of drugs. *Clin Pharmacokinet.*v. 51, p.481-99, 2012.

DUBY, J.J., CAMPBELL, R.K.; SETTER, S.M.; WHITE, J.R.; RASMUSSEN, K.A. Diabetic neuropathy: an intensive review. **Am J Health Syst Pharm.**, v.61, n. 2, p. 160-173, 2004.

DUCHEN, L.W.; ANJORIN, A.; WATKINS, P.J.; MACKAY, J.D. Pathology of autonomic neuropathy in diabetes mellitus. **Ann Intern Med.**, v. 92, n.2, p. 301-303, 1980.

EICH, E.; PERTZ, H.; KALOGA, M.; SCHULZ, J.; FESEN, M.R.; MAZUMDER, A.; POMMIER, Y.(-)-Arctigenin as a lead structure for inhibitors of human immunodeficiency virus type-1 integrase. **J Med Chem.**, v. 39, n. 1, p. 86-95, 1996.

EISNER, T. Chemical prospecting: A proposal for action. **Ecology Economics and Ethics: The broken circle**, 1992, 196-202.

EL-ZAHABY, S.A.; KASSEM, A.A.; EL-KAMEL, A.H. Helicobacter pylori: An Overview on Antimicrobials and Drug Delivery Systems for its Eradication. **Curr Drug Deliv.**, v.11, n.3, p. 306-312, 2014.

FARRÉ, R.; TACK, J. Food and symptom generation in functional gastrointestinal disorders: physiological aspects. **Am J Gastroenterol.**, v. 108, n.5, p. 698-706, 2013.

FARRUGIA, G. Interstitial cells of Cajal in health and disease. **Neurogastroenterol Motil.**, v.20, n. 1, p. 54-63, 2008.

FELDMAN, M.; SCHILLER, L.R. Disorders of gastrointestinal motility associated with diabetes mellitus. **Ann Intern Med.** , v. 3, p. 378-84, 1983.

FERRACANE, R.; GRAZIANI, G.; GALLO, M.; FOGLIANO, V.; RITIANE, A. Metabolic profile of the bioactive compounds of burdock (*Arctium lappa* L.) seeds, root and leaves. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, p. 175-181, 2010.

FIALKOW, L.; WANG, Y.; DOWNEY, G.P. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. **Free Radic Biol Med.**, v. 42, n.2, p. 153-164, 2007.

FIORUCCI, S.; ANTONELLI, E.; MORELLI, A. Mechanism of non-steroidal anti-inflammatory drug-gastropathy. **Dig Liver Dis.**, v. 33, n. 2, p. S35-43, 2001.

FLEMSTRÖM, G.; HÄLLGREN, A.; NYLANDER, O.; ENGSTRAND, L.; WILANDER, E.; ALLEN, A. Adherent surface mucus gel restrict diffusion of macromolecules in rat duodenum in vivo. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 227, p. G375 – G382, 1999.

FOGLE, C.J. Diabetic gastroparesis: an overview of diagnostic and treatment strategies. **Adv NPs PAs.**, v. 4, n.11, p. 14-8, 2013.

FOGLIO, M.A.; DIAS, P.C.; ANTÔNIO, M.A.; POSSENTI, A.; RODRIGUES, R.A.; DA SILVA, E.F.; REHDER, V.L.; DE CARVALHO, J.E. Antiulcerogenic activity of some sesquiterpene lactones isolated from *Artemisia annua*. *Planta Med.*, v. 68, n.6, p. 515-8, 2002.

FONT QUER, P. **Plantas medicinales. El Discórides renovado.** 11 ed. Barcelona: Labor S.A., 1988.

FORNAI, M.; NATALE, G.; COLUCCI, R.; TUCCORI, M.; CARAZZINA, G.; ANTONIOLI, L.; BALDI, S.; LUBRANO, V.; ABRAMO, A.; BLANDIZZI, C.; DEL TACCA, M. Mechanisms of protection by pantoprazole against NSAID-induced gastric mucosal damage. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 372, p. 79–87, 2005.

FORTE, J.G.; YAO, X. The membrane-recruitment-and-recycling hypothesis of gastric HCl secretion. **Trends Cell Biol.**, v. 6, n.2, p. 45-48, 1996.

FRANCO, L.; MANARA, P.; ERBETTI, I.; VELO, G.P. Anti-ulcer activity of carbenoxolone and ISF 3401 on PGE2 release in rat gastric mucosa. **Pharmacol Res.**, v. 27, n.2, p. 141-150, 1993.

FRASER, R.J.; HOROWITZ, M.; MADDOX, A.F.; HARDING, P.E.; CHATTERTON, B.E.; DENT, J. Hyperglycaemia slows gastric emptying in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. **Diabetologia.**, v. 33, n.11, p. 675-680, 1990.

GANGULA, P.R.; MANER, W.L.; MICCI, M.A.; GARFIELD, R.E.; PASRICHA, P.J. Diabetes induces sex-dependent changes in neuronal nitric oxide synthase dimerization and function in the rat gastric antrum. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 292, n.3, p. G725-G733, 2007.

GANGULA, P.R.; MUKHOPADHYAY, S.; RAVELLA, K.; CAI, S.; CHANNON, K.M.; GARFIELD, R.E.; PASRICHA, P.J. Tetrahydrobiopterin (BH4), a cofactor for nNOS, restores gastric emptying and nNOS expression in female diabetic rats. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 298, n.5, p. G692-G699, 2010a.

GANGULA, P.R.; MUKHOPADHYAY, S.; PASRICHA, P.J.; RAVELLA, K. Sepiapterin reverses the changes in gastric nNOS dimerization and function in diabetic gastroparesis. **Neurogastroenterol Motil.**, v. 22, n.12, p.1325-1331, e351-2, 2010b.

GANOG, W.F. **Review of medical physiology**. 21 ed. San Francisco: Lange Medical Books, 2003.

GAŠIĆ, U.; KEČKEŠ, S.; DABIĆ, D.; TRIFKOVIĆ, J.; MILOJKOVIĆ-OPSENICA, D.; NATIĆ, M.; TEŠIĆ, Z. Phenolic profile and antioxidant activity of Serbian polyfloral honeys. **Food Chem.**, v.15, n.145, p.599-607, 2014.

GATOPOULOU, A.; PAPANAS, N.; MALTEZOS, E. Diabetic gastrointestinal autonomic neuropathy: current status and new achievements for everyday clinical practice. **Eur J Intern Med.**, v. 23, n.6, p. 499-505, 2012.

GENTIL, M.; PEREIRA, J.V.; SOUSA, Y.T.C.S.; PIETRO, R.; NETO, M.D.S.; VANSAN, L.P.; FRANÇA, S.C. In vitro evaluation of the antibacterial activity of *Arctium lappa* as a phytotherapeutic agent used in intracanal dressings. **Phytother.Res.** v.20, p.184-186, 2006.

GILL, J.M.; PLAYER, M.S.; METZ, D.C. Balancing the risks and benefits of proton pump inhibitors. **Ann Fam Med.**, v. 9, n.3, p.200-202, 2011.

GLIGOROV, J.; LOTZ, J.P. Preclinical pharmacology of the taxanes: implications of the differences. **Oncologist.**, v.9, n. 2, p. 3-8, 2004.

GOLBIDI, S.; EBADI, S.A.; LAHER, I. Antioxidants in the treatment of diabetes. **Curr Diabetes Rev.**, v. 7, n.2, p. 106-125, 2011.

GONDI, M.; BASHA, S.A.; BHASKAR, J.J.; SALIMATH, P.V.; PRASADA RAO, U.J. Antidiabetic effect of dietary mango (*Mangifera indica* L.) peel in streptozotocin-induced diabetic rats. **J Sci Food Agric.** [Epub ahead of print], 2014.

GOODMAN & GILMAN – **As bases farmacológicas da terapêutica**, Joel Hardman e Lee E. Limbird, 10 ed. , Rio de Janeiro, 2003.

GRAHAM, D.Y. History of *Helicobacter pylori*, duodenal ulcer, gastric ulcer and gastric cancer. **World J Gastroenterol.**, v. 20, n.18, p. 5191-204, 2014.

GUGLIUCCI, A.; BASTOS, D.H.; SCHULZE, J.; SOUZA, M.F. Caffeic and chlorogenic acids in *Ilex paraguariensis* extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins. **Fitoterapia.**, v. 80, n.6, p. 339-44, 2009.

GU, Y.; SCHEUER, C.; FENG, D.; MENDER, M.D.; LASCHKE, M.W. Inhibition of angiogenesis: a novel antitumor mechanism of the herbal compound arctigenin. **Anticancer Drugs.**, v. 24, n.8, p. 781-791, 2013.

GUY, R.J.; DAWSON, J.L.; GARRETT, J.R.; LAWS, J.W.; THOMAS, P.K.; SHARMA, A.K.; WATKINS, P.J. Diabetic gastroparesis from autonomic neuropathy: surgical

considerations and changes in vagus nerve morphology. **J Neurol Neurosurg Psychiatry.**, v.47, n.7, p.686-691, 1984.

HABIG, W.H.; PABST, M.J.; FLEISCHNER, G.; GATMAITAN, Z.; ARIAS, I.M.; JAKOBY, W.B. The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v.71, n.10, p. 3879-82, 1974.

HASHIMOTO, H.; KUSHIKATA, T.; KUDO, M.; HIROTA, K. Does long-term medication with a **proton pump** inhibitor induce a tolerance to H₂ receptor antagonist? **J Gastroenterol.**, v. 42, n.4, p. 275-278, 2007.

HASLER, W.L.; PARKMAN, H.P.; WILSON, L.A.; PASRICHA, P.J.; KOCH, K.L.; ABELL, T.L.; SNAPE, W.J.; FARRUGIA, G.; LEE, L.; TONASCIA, J.; UNALP-ARIDA, A.; HAMILTON, F. Psychological dysfunction is associated with symptom severity but not disease etiology or degree of gastric retention in patients with gastroparesis. **Am J Gastroenterol.**, v. 105, n.11, p. 2357-2367, 2010.

HARSCH, I.A.; BRZOZOWSKI, T.; BAZELA, K.; KONTUREK, S.J.; KUKHARSKY, V.; PAWLIK, T.; PAWLOWSKI, E.; HAHN, E.G.; KONTUREK, P.C. Impaired gastric ulcer healing in diabetic rats: role of heat shock protein, growth factors, prostaglandins and proinflammatory cytokines. **Eur J Pharmacol.**, v. 481, n. 2-3, p. 249-260, 2003.

HARSCH, I.A.; KOEBNICK, C.; TASI, A.M.; HAHN, E.G.; KONTUREK, P.C. Ghrelin and obestatin levels in type 2 diabetic patients with and without delayed gastric emptying. **Dig Dis Sci.**, v. 54, n.10, p. 2161-2166, 2009.

HASLER, W.L.; COLESKI, R.; CHEY, W.D.; KOCH, K.L.; MCCALLUM, R.W.; WO, J.M.; KUO, B.; SITRIN, M.D.; KATZ, L.A.; HWANG, J.; SEMLER, J.R.; PARKMAN, H.P. Differences in intragastric pH in diabetic vs. idiopathic gastroparesis: relation to degree of gastric retention. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 294, n.6, p. G1384-G1391, 2008.

HONORÉ, S.M.; ZELARAYAN, L.C.; GENTA, S.B.; SÁNCHEZ, S.S. Neuronal loss and abnormal BMP/Smad signaling in the myenteric plexus of diabetic rats. **Auton Neurosci.**, v. 164, n.1-2, p. 51-61, 2011.

HOPE, B.T.; MICHAEL, G.J.; KNIGGE, K.M.; VINCENT, S.R. Neuronal **NADPH diaphorase** is a **nitric oxide synthase**. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, 88(7):2811-2814, 1991.

HOOGERWERF, W.; PASRICHA, P.J. Agentes usados para o controle da acidz gástrica e no tratamento de úlceras pépticas e da doença do refluxo gastroesofágico. In:

HUANG, J.Q.; HUNT, R.H. pH, healing rate and symptom relief in acid-related diseases. **Yale J Biol Med.**, v. 69, n.2, p. 159-174, 1996.

HUANG, T.C.; TSAI, S.S.; LIU, L.F.; LIU, Y.L.; LIU, H.J.; CHUANG, K.P. Effect of *Arctium lappa* L. in the dextran sulfate sodium colitis mouse model. **World J Gastroenterol.**, v. 16, n. 33, p. 4193-4199, 2010.

HSIEH, C.J.; KUO, P.L.; HSU, Y.C.; HUANG, Y.F.; TSAI, E.M.; HSU, Y.L. Arctigenin, a dietary phytoestrogen, induces apoptosis of estrogen receptor-negative breast cancer cells through the ROS/p38 MAPK pathway and epigenetic regulation. **Free Radic Biol Med.**, v. 67, p. 159-170, 2014.

IDB, 2010. MINISTÉRIO DA SAUDE. Disponível em : <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2010/matriz.htm>. Acesso em : 18/04/2014.

IDF, 2013. INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION – DIABETES ATLAS. Disponível em : http://www.idf.org/sites/default/files/EN_6E_Atlas_Full_0.pdf. Acesso em : 18/04/2014.

INTERNATIONAL EXPERT COMMITTEE. International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. **Diabetes Care**, v. 32, p. 1327–1334, 2009.

JACK, M.; WRIGHT, D. Role of advanced glycation endproducts and glyoxalase I in diabetic peripheral sensory neuropathy. **Transl Res.**, v. 159, n.5, p. 355-365, 2012.

JACKSON, M.W.; GORDON, T.P. A novel impedance-based cellular assay for the detection of anti-calcium channel autoantibodies in type 1 diabetes. **J Immunol Methods.**, v. 361, n. 1-2, p. 31-36, 2010.

JAIN, K.S.; SHAH, A.K.; BARIWAL, J.; SHELKE, S.M.; KALE, A.P.; JAGTAP, J.R.; BHOSALE, A.V. Recent advances in proton pump inhibitors and management of acid-peptic disorders. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v.15, p. 1181-1205, 2007.

JAIN, R.N.; SAMUELSON, L.C. Differentiation of the gastric mucosa. II. Role of gastrin in gastric epithelial cell proliferation and maturation. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 291, n.5, p. G762-G765, 2006.

JAMES, A.N.; RYAN, J.P.; CROWELL, M.D.; PARKMAN, H.P. Regional gastric contractility alterations in a diabetic gastroparesis mouse model: effects of cholinergic and serotonergic stimulation. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 287, n.3, G612-G619, 2004.

JEBBINK, H.J.; BRUIJS, P.P.; BRAVENBOER, B.; AKKERMANS, L.M.; VAN BERGEHENEGOUWEN, G.P.; SMOUT, A.J. Gastric myoelectrical activity in patients with type I diabetes mellitus and autonomic neuropathy. **Dig Dis Sci.**, v. 39, n. 11, p. 2376-2383, 1994.

JUNG, H.K. The incidence, prevalence, and survival of gastroparesis in olmsted county, Minnesota, 1996-2006. **J Neurogastroenterol Motil.**, v. 16, n. 1, p. 99-100, 2010.

JUNG, Y.D.; KIM, M.S.; LEE, K.S.; KANG, I.C.; NAH, A.S.; SONG, D.U.; YANG, S.Y.; KIM, J.K.; AHN, B. W. 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002)

inhibits nitric oxide production in cultured murine astrocytes. **Pharmacol Res.**, v. 40, n.5, p. 423-427.

KALLAYA, E.; SUTHILUK, P.; NARUEMON, V.; DUANGPORN, T. Effects of Aloe vera and sucralfate on gastric microcirculatory changes, cytokine levels and gastric ulcer healing in rats. **World J Gastroenterol.**, v. 7, n.12, p. 2034-2039, 2006.

KANGWAN, N.; PARK, J.M.; KIM, E.H.; HAHM, K.B. Quality of healing of gastric ulcers: Natural products beyond acid suppression. **World J Gastrointest Pathophysiol.**, v. 5, n. 1, p. 40-47, 2014.

KAPLAN, K.A.; ODABASOGLU, F.; HALICI, Z.; HALICI, M.; CADIRCI, E.; ATALAY, F.; AYDIN, O.; CAKIR, A. Alpha-lipoic acid protects against indomethacin-induced gastric oxidative toxicity by modulating antioxidant system. **J Food Sci.**, v. 77, n. 11, p. H224-H230, 2012.

KARAMANOLIS, G.; TACK, J. Promotility medications--now and in the future. **Dig Dis.**, v. 24, n.3-4, p. 297-307, 2006.

KARASAWA, H.; TANI, N.; MIWA, T. The effect of omeprazole on ultrastructural changes in gastric parietal cells. **Gastroenterol Jpn.**, v. 23, n. 1, p. 1-8, 1998.

KARDOSOVÁ, A.; EBRINGEROVÁ, A.; ALFÖLDI, J.; NOSÁL'OVÁ, G.; FRANOVÁ, S.; HRÍBALOVÁ, V. A biologically active fructan from the roots of *Arctium lappa* L., var. *Herkules*. **Internacional Journal Biological Macromolecule**, v. 33, p. 135-140, 2003.

KESTON, A.S.; BRANDT, R. The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. **Anal Biochem.**, v.11, p. 1-5, 1965.

KHANNA, M.U.; ABRAHAM, P. Determinants of acid secretion. **Assoc Physicians India.**, v. 38, n. 1, p. 727-730, 1990.

KHOO, J.; RAYNER, C.K.; FEINLE-BISSET, C.; JONES, K.L.; HOROWITZ, M. Gastrointestinal hormonal dysfunction in gastroparesis and functional dyspepsia. **Neurogastroenterol Motil.**, v. 22, n. 12, p. 1270-1278, 2010.

KIM, S.J.; PARK, J.H.; SONG, D.K.; PARK, K.S.; LEE, J.E.; KIM, E.S.; CHO, K.B.; JANG, B.K.; CHUNG, W.J.; HWANG, J.S.; KWON, J.G.; KIM, T.W. Alterations of colonic contractility in long-term diabetic rat model. **J Neurogastroenterol Motil.**, v. 17, n.4, 372-380, 2011.

KOBAYASHI, N.; KATAOKA, T.; ONO, A.; TSUKIMI, Y.; OKABE, S. Role of p38 mitogen-activated protein kinase in the healing of gastric ulcers in rats. **J Physiol Pharmacol.**, v. 52, n.2, p. 195-210, 2001.

KOC, M.; IMIK, H.; ODABASOGLU, F. Gastroprotective and anti-oxidative properties of ascorbic acid on indomethacin-induced gastric injuries in rats. **Biol Trace Elem Res.** v.126, n.1-3, p.222-236, 2008.

KOCH, C.A.; UWAIFO, G.I. Are gastrointestinal symptoms related to diabetes mellitus and glycemic control? **Eur J Gastroenterol Hepatol.**, v. 20, n. 9, p. 822-825, 2008.

KOCH, K.L. Diabetic gastropathy: gastric neuromuscular dysfunction in diabetes mellitus: a review of symptoms, pathophysiology, and treatment. **Dig Dis Sci.**, v. 44, n. 6, p. 1061-1075, 1999.

KOCH, K.L. Diabetic gastropathy: gastric neuromuscular dysfunction in diabetes mellitus: a review of symptoms, pathophysiology, and treatment. **Dig Dis Sci.**, v. 44, n. 6, p. 1061-1075, 1999.

KONAGAYA, T.; BERNSTAND, M.; NORLÉN, P.; HÅKANSON, R. Mobilization of rat stomach ECL-cell histamine in response to short- or long-term treatment with omeprazole and/or YF 476 studied by gastric submucosal microdialysis in conscious rats. **Br J Pharmacol.**, v. 133, n.1, p. 37-42, 2001.

KONTUREK, P.C.; BRZOZOWSKI, T.; BURNAT, G.; SZLACHCIC, A.; KOZIEL, J.; KWIECIEN, S.; KONTUREK, S.J.; HARSCH, I.A. Gastric ulcer healing and stress-lesion preventive properties of pioglitazone are attenuated in diabetic rats. **J Physiol Pharmacol.**, v. 61, n. 4, p. 429-436, 2010.

KONTUREK, P.C.; KONTUREK, S.J.; BURNAT, G.; BRZOZOWSKI, T.; BRZOZOWSKA, I.; REITER, R. J. Dynamic physiological and molecular changes in **gastric ulcer** healing achieved by melatonin and its precursor L-tryptophan in rats. **J Pineal Res.**, v. 45, n. 2, p.180-190, 2008.

KONTUREK, S.J.; KONTUREK, P.C.; BRZOZOWSKI, T. Prostaglandins and ulcer healing. **J Physiol Pharmacol.**, v. sep., p. 56, 2005.

KONTUREK, S.J.; RADECKI, T.; PIASTUCKI, I.; BRZOZOWSKI, T.; DROZDOWICZ, D. Gastrocytoprotection by colloidal bismuth subcitrate (De-Nol) and sucralfate. Role of endogenous prostaglandins. **Gut.**, v. 28, n. 2, p. 201-205, 1987.

KONTUREK, S.J.; BRZOZOWSKI, T.; MAJKA, J.; DEMBINSKI, A.; SLOMIANY, A.; SLOMIANY, B.L. Transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in protection and healing of gastric mucosal injury. **Scand J Gastroenterol.**, v. 27, n. 8, p. 649-55, 1992.

KONTUREK, P.C.; BRZOZOWSKI, T.; BURNAT, G.; SZLACHCIC, A.; KOZIEL, J.; KWIECIEN, S.; KONTUREK, S.J.; HARSCH, I.A. Gastric ulcer healing and stress-lesion preventive properties of pioglitazone are attenuated in diabetic rats. **J Physiol Pharmacol.**, v. 61, n. 4, p. 429-436, 2010.

KONTUREK, P.C.; KONTUREK, S.J.; BURNAT, G.; BRZOZOWSKI, T.; BRZOZOWSKA, I.; REITER, R.J. Dynamic physiological and molecular changes in gastric ulcer healing achieved by melatonin and its precursor L-tryptophan in rats. **Journal of Pineal Research.** , v. 45, p. 180-190, 2008.

KOROLKIEWICZ, R.P.; TASHIMA, K.; FUJITA, A.; KATO, S.; TAKEUCHI, K. Exogenous insulin-like growth factor (IGF)-1 improves the impaired healing of gastric mucosal lesions in diabetic rats. **Pharmacol Res.**, v. 41, n.2, 221-229, 2000.

KUBO, K.; UEHARA, H.; KUBOTA, T.; NOZU, T.; MORUYA, M.; WATANABE, Y.; SHOJI, E.; SANTOS, S. B.; HARADA, K.; KONGO, Y. Effects of ranitidine on gastric vesicles containing H⁺, K⁺ - ATPase adenosine triphosphatase in rats. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 30, p. 944-951, 1995.

KUSTERS, J.G.; VAN VLIET, A.H.; KUIPERS, E.J. Pathogenesis of Helicobacter pylori infection. **Clin Microbiol Rev.**, v. 19, n. 3, p. 449-490, 2006.

KWIECIEN, S.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, S. J. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. **Journal of Physiology and Pharmacology.** v.53, p.39-50, 2002.

LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric Mucosal Defense and Cytoprotection: Bench to Bedside. **Gastroenterology**, v.135, p.41-60, 2008.

LAMIAN, V.; RICH, A.; MA, Z.; LI, J.; SEETHALA, R.; GORDON, D.; DUBAQUIE, Y. Characterization of agonist-induced motilin receptor trafficking and its implications for tachyphylaxis. **Mol Pharmacol.**, v. 69, n. 1, p. 109-118, 2006.

LAWRENCE, R.A.; BURK, R.F. Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 71, p. 952-958, 1976.

LEME, P.L.S.; DE CARVALHO, D.L.M.; MALHEIROS, C. A. Indicações atuais do tratamento operatório da úlcera péptica **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 49, n. 2, 2003.

LEONARD, S.S.; KEIL, D.; MEHLMAN, T.; PROPER, S.; SHI, X.; HARRIS, G.K. Essiac tea: scavenging of reactive oxygen species and effects on DNA damage. **J. Ethnopharmacol.**, v. 103, p. 288-296, 2006.

LI, D.; LIU, Q.; JIA, D.; DOU, D.; WANG, X.; KANG, T. Protective effect of arctigenin against MPP⁺ and MPTP-induced neurotoxicity. **Planta Med.**, v. 80, n. 1, p. 48-55, 2014.

LIN, S.C.; CHUNG, T.C.; LIN, C.C.; UENG, T.H.; LIN, Y.H.; LINS, Y.; WANG, L.Y. Hepatoprotective effects of *Arctium lappa* on carbon tetrachloride- and acetaminophen-induced liver damage. **Am. J. Chin. Med.**, v. 28, p. 163-173, 2000.

LIN, S.C.; LIN, C.H.; LIN, C.C.; LIN, Y.H.; CHEN, C.F.; CHEN, I.C.; WANG, L.Y. Hepatoprotective effects of *Arctium lappa* Linne on liver injuries induced by chronic ethanol consumption and potentiated by carbon tetrachloride. **J. Biomed Sci.**, v. 9, p.38-46, 2002.

LIN, L. Z.; HARNLY, J. M. Identification of hydroxy cinnamoylquinic acids of arnica flowers and burdock roots using a standardized LC-DAD-ESI/MS profiling method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 10105-10114, 2008.

LIU, S.; CHEN, K.; SCHLIEMAN, D. Isolation and identification of arctiin e arctigenin in leaves of burdock (*Arctium lappa* L.) by polyamide column chromatography in combination with HPLC-ESI/MS. **Phytochemical Analysis**, v.16, p. 86-89, 2005.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Plantarum, 2002. 544p.

LOU, Z.; WANG, H.; ZHU, S.; ZHANG, M.; GAO, Y.; MA, C.; WANG, Z. Improved extraction and identification by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry of phenolic compounds in burdock leaves. **J Chromatogr A** , v. 1217, n. 16, p. 2441-2446, 2010.

LUIZ-FERREIRA, A.; ALMEIDA, A.C.; COLA, M.; BARBASTEFANO, V.; ALMEIDA, A.B.; BATISTA, L.M.; FARIAS-SILVA, E.; PELLIZZON, C.H.; HIRUMA-LIMA, C.A.; SANTOS, L.C.; VILEGAS, W.; BRITO, A.R. Mechanisms of the **gastric** antiulcerogenic activity of *Anacardium humile* St. Hil on ethanol-induced acute **gastric** mucosal injury in rats. **Molecules**., v. 15, n. 10, p. 7153-7166, 2010.

LU, L.C.; ZHOU, W.; LI, Z.H.; YU, C.P.; LI, C.W.; LUO, M.H.; XIE, H. Effects of arctiin on streptozotocin-induced diabetic retinopathy in Sprague-Dawley rats. **Planta Medica**., v.78, n. 12, p. 1317-1323, 2012..

LUMME, A.; VANHATALO, S.; SOINILA, S. Axonal transport of nitric oxide synthase in autonomic nerves. **J Auton Nerv Syst**., v. 56, n. 3, p. 207-214, 1996.

LYONS, C.R. The role of nitric oxide in inflammation. **Adv Immunol**., v. 60, p. 323-371, 1975.

MA, S.T.; LIU, D.L.; DENG, J.J.; NIU, R.; LIU, R.B. Effect of arctiin on glomerular filtration barrier damage in STZ-induced diabetic nephropathy rats. **Phytother Res**., v. 27, n. 10, p. 1474-1480, 2013.

MALFERTHEINER, P.; CHAN, F.K.; MCCOLL, K.E. Peptic ulcer disease. **Lancet**, v.374, p.1449- 1461, 2009

MARIA-FERREIRA, D.; DA SILVA L.M.; MENDES, D.A.; CABRINI, D DE A.; NASCIMENTO, A.M.; IACOMINI, M.; CIPRIANI, T.R.; SANTOS, A.R.; WERNER, M.F.; BAGGIO, C.H .Rhamnogalacturonan from *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen: gastroprotective and ulcer healing properties in rats. **PLoS One**., v. 9, n.1, e84762, 2014.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **Eur J Biochem**., v.47, n. 3, 469-474, 1974.

MARRINAN, S.; EMMANUEL, A.V.; BURN, D.J. Delayed gastric emptying in Parkinson's disease. **Mov Disord**., v. 29, n.1, p. 23-32, 2014.

MATTHEWS, G.M.; HOWARTH, G.S.; BUTLER, R.N. Nutrient and antioxidant modulation of apoptosis in gastric and colon cancer cells. **Cancer Biol Ther.**, v. 6, p. 569-572, 2006.

MCINTYRE, K.L.; HARRIS, C.S.; SALEEM, A.; BEAULIEU, L.P.; TA, C.A.; HADDAD, P.S.; ARNASON, J.T. Seasonal phytochemical variation of anti-glycation principles in lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium*). **Planta Med.**, v. 75, n. 3, p. 286-292, 2009.

MISHIMA, Y.; AMANO, Y.; TAKAHASHI, Y.; MISHIMA, Y.; MORIYAMA, N.; MIYAKE, T.; ISHIMURA, N.; ISHIHARA, S.; KINOSHITA, Y. Gastric emptying of liquid and solid meals at various temperatures: effect of meal temperature for gastric emptying. **J Gastroenterol.**, v. 44, n.5, p.412-418, 2009.

MILANI, S.; CALABRÒ, A. Role of growth factors and their receptors in gastric healing. **Microscopy Research and Technique**. v.53, p.3060-371, 2001.

MITSUO, M.; NOBUO, Y.; KATSUYA, T. Inhibitory compounds of alpha glucosidase activity from *Arctium lappa* L. **Journal of Japan Oil Chemists' Society**, v. 54, p. 589–594, 2005.

MIYAMOTO, Y.; YONEDA, M.; MORIKAWA, A.; ITOH, H.; MAKINO, I. Gastric neuropeptides and gastric motor abnormality in streptozotocin-induced diabetic rats: observation for four weeks after streptozotocin. **Dig Dis Sci.**, v. 46, n.8, p. 1596-603, 2001.

MOHAN KUMAR, M.; JOSHI, M.C.; PRABHA, T.; DORABABU, M.; GOEL, R.K. Effect of plantain banana on gastric ulceration in NIDDM rats: role of gastric mucosal glycoproteins, cell proliferation, antioxidants and free radicals. **Indian J Exp Biol.**, v. 44, n.4, p. 292-299, 2006.

MOUDI, M.; GO, R.; YIEN, C.Y.; NAZRE, M. Vinca alkaloids. **Int J Prev Med.**, v. 4, n. 11, 1231-1235, 2013.

MOULI, V.P.; AHUJA, V. Proton pump inhibitors: concerns over prolonged use. **Trop Gastroenterol.**, v. 32, n.3, p. 175-184, 2011.

MORIMOTO, Y.; SHIMOHARA, K.; OSHIMA, S.; SUKAMOTO, T. Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. **Jpn J Pharmacol.**, v. 57, n. 4, 495-505, 1991.

MOWRY R, WINKLER CH. The coloration of acidic carbo hydrates of bacteria and fungi in tissue sections with special reference to capsules of *Cryptococcus neoformans* *Pneumococci* and *Staphilococci*. **Am J Pathol**;32:628–9, 1956.

MURAKAMI, S.; ARAI, L.; MURAMATSU, M.; OTOMO, S.; BABA, K.; KIDO, T.; KOZAWA, M. Inhibition of gastric H⁺, K⁺ - ATPase and acid secretion by cassigarol A , a polyphenol from *Cassia garrettiana* Craib. **Biochem. Pharmacol.**, v. 44, p. 33-37, 1992.

NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T.; MATSUYAMA, K.; NISHIMURA, S.; YAGI, N.; KONDO, M. Effects of free radical scavengers on indomethacin-induced aggravation of gastric ulcer in rats. **Dig Dis Sci.**, v. 40, n. 9, p. 2019-2021, 1995.

NAITO, Y.; TAKAGI, T.; OYA-ITO, T.; OKADA, H.; SUZUKI, T.; HIRATA, I.; HIRAI, M.; UCHIYAMA, K.; HANDA, O.; UCHIDA, K.; YOSHIKAWA, T. Impaired gastric ulcer healing in diabetic mice: role of methylglyoxal. **J Physiol Pharmacol.**, v.60, n.7, p. 123-130, 2009.

NDDG: Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. **Diabetes**, v. 28, p. 1039– 1057, 1979

NOHARA, S.; IWASE, M.; IMOTO, H.; SASAKI, N.; NAKAMURA, U.; UCHIZONO, Y.; ABE, S.; DOI, Y.; IIDA, M. Gastric emptying in patients with Type 2 diabetes mellitus and diabetes associated with mitochondrial DNA 3243 mutation using ¹³C-octanoic acid breath test. **J Diabetes Complications.**, v. 20, n. 5, p. 295-301, 2006.

OFMAN, J.J.; ETCHASON, J.; ALEXANDER, W.; STEVENS, B.R.; HERRIN, J.; CANGIALOSE, C.; BALLARD, D.J.; BRATZLER, D.; ELWARD, K.S.; FITZGERALD, D.; CULPEPPER-MORGAN, J.; MARSHALL, B. The Quality of Care for Medicare Patients With Peptic Ulcer Disease. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 95, n. 1, 2000.

OKABE, S.; AMAGASE, K. An Overview of Acetic Acid Ulcer Models —The History and State of the Art of Peptic Ulcer Research. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.28, n.8, 2005.

OKABE, S., ROTH, L.A., PFEIER, J. A method of experimental penetrating gastric and duodenal, ulcers in rats. **Am J Dig Dis.**, v.16, p. 277–280, 1971.

OPOKA, W.; ADAMEK, D.; PLONKA, M.; RECZYNSKI, W.; BAS, B.; DROZDOWICZ, D.; JAGIELSKI, P.; SLIWOWSKI, Z.; ADAMSKI, P.; BRZOZOWSKI, T. Importance of luminal and mucosal zinc in the mechanism of experimental gastric ulcer healing. **J Physiol Pharmacol.**, v. 61, n.5, p 581-591, 2010.

ORDÖG T. Interstitial cells of Cajal in diabetic gastroenteropathy. **Neurogastroenterol Motil.**, v. 20, n. 1, p. 8-18, 2008.

OWU, D.U.; OBEMBE, A.O.; NWOKOCHA, C.R.; EDOHO, I.E.; OSIM, E.E. Gastric ulceration in diabetes mellitus: protective role of vitamin C. **ISRN Gastroenterol.**, v. 2012, p.362805, 2012.

PALILEO, C.; KAUNITZ, J.D. Gastrointestinal defense mechanisms. **Curr Opin Gastroenterol.**, v.27, n. 6, p. 543-548, 2011.

PALMER, A.J.; ROZE, S.; VALENTINE, W.J.; MINSHALL, M.E.; FOOS, V.; LURATI, F.M.; LAMMERT, M.; SPINAS, G.A. The CORE Diabetes Model: Projecting long-term clinical outcomes, costs and cost-effectiveness of interventions in diabetes mellitus (types 1

and 2) to support clinical and reimbursement decision-making. **Curr Med Res Opin.**, v. 20, n. 1, p. S5-26, 2004.

PARK, S. Y.; HONG, S. S.; HAN, X. H.; HWANG, J. S.; LEE, D.; RO, J. S.; HWANG, B. Y. Lignans from *Arctium lappa* and Their Inhibition of LPS-Induced Nitric Oxide Production. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, p. 150-152, 2007.

PARKMAN, H.P.; MISHRA, A.; JACOBS, M.; PATHIKONDA, M.; SACHDEVA, P.; GAUGHAN, J.; KRYNETSKIY, E. Clinical response and side effects of **metoclopramide**: associations with clinical, demographic, and pharmacogenetic parameters. **J Clin Gastroenterol.** v. 46, n.6, p. 494-503, 2012.

PARKMAN, H.P.; YATES, K.; HASLER, W.L.; NGUYEN, L.; PASRICHA, P.J.; SNAPE, W.J.; FARRUGIA, G.; KOCH, K.L.; ABELL, T.L.; MCCALLUM, R.W.; LEE, L.; UNALP-ARIDA, A.; TONASCIA, J.; HAMILTON, F. Clinical features of idiopathic **gastroparesis** vary with sex, body mass, symptom onset, delay in gastric emptying, and gastroparesis severity. **Gastroenterology.**, v. 140, n.1, p. 101-115, 2011.

PEDROSA, H. C.; MACEDO, G. C.; RIBEIRO, J. Pé diabético. In: LYRA, R.; CAVALCANTI, N. Diabetes Mellitus. Rio de Janeiro: Diagraph, 2006, 557-68.

PENSTON, J.; WORMSLEY, K.G. Adverse reactions and interactions with H2-receptor antagonists. **Med Toxicol.**, v. 1, n. 3, p. 192-216, 1986.

PEREIRA, I.T.; BURCI, L.M.; DA SILVA, L.M.; BAGGIO, C.H.; HELLER, M.; MICKE, G.A.; PIZZOLATTI, M.G.; MARQUES, M.C.; WERNER, M.F. Antiulcer effect of bark extract of *Tabebuia avellanedae*: activation of cell proliferation in gastric mucosa during the healing process. **Phytother Res.**, v. 27, n. 7, 1067-1073, 2013.

PEREIRA, J.V., BERGAMO, D.C.B., PEREIRA, J.O., FRANÇA, S.C., PIETRO, R., SOUSA, Y.T.C.S. Antimicrobial activity of *Arctium lappa* constituents against microorganisms commonly found in endodontic infections. **Braz. Dent. J.**, v.16, p.192-196, 2005.

PIARULLI, F.; SARTORE, G.; LAPOLLA, A. Glyco-oxidation and cardiovascular complications in type 2 diabetes: a clinical update. **Acta Diabetol.**, v. 50, n. 2, 101-110, 2013.

PIETZSCH, M.; THEUER, S.; HAASE, G.; PLATH, F.; KEYSER, M.; RIETHLING, A.K. Results of systematic screening for serious gastrointestinal bleeding associated with NSAIDs in Rostock hospitals. **Int J Clin Pharmacol Ther.**, v. 40, n. 3, p. 111-115, 2002.

POECKEL, D.; GREINER, C.; VERHOFF, M.; RAU, O.; TAUSCH, L.; HOERNIG, C.; STEINHILBER D.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, M.; WERZ, O. Carnosic acid and carnosol potently inhibit human 5-lipoxygenase and suppress pro-inflammatory responses of stimulated human polymorphonuclear leukocytes. **Biochemical pharmacology.** v.76, p. 91-97, 2008.

POTRICH, F.B.; ALLEMAND, A.; DA SILVA, L.M.; DOS SANTOS, A.C.; BAGGIO, C.H.; FREITAS, C.S.; MENDES, D.A.; ANDRE, E.; WERNER, M.F.; MARQUES, M.C. Antiulcerogenic activity of hydroalcoholic extract of *Achillea millefolium* L.: involvement of the antioxidant system. **J Ethnopharmacol.**, v. 130, n. 1, p. 85-92, 2010.

POYNTER, D.; PICK, C.R.; HARCOURT, R.A.; SELWAY, S.A.; AINGE, G.; HARMAN, I.W.; SPURLING, N.W.; FLUCK, P.A.; COOK, J.L. Association of long lasting unsurmountable histamine H2 blockade and gastric carcinoid tumours in the rat. **Gut.**, v. 26, n. 12, p. 1284-1295, 1985.

PONTES, F.S.C.; PONTES, H.A.R.; LIMA, I.P.; JEHA, L.H.; CARDOSO, D.G. Diabete Melito e Doença Periodontal. **Rev. Int. Periodont. Clin.**, v. 1, p. 37-39, 2004.

PREDES, F. S.; TARCÍZIO, J. C. M.; PAULA, A. R. Evaluation of rat testes treated with *Arctium lappa* L.: morphometric study. **Braz. J. Morphol. Sci**, v. 24, n. 2, p. 112-117, 2007.

QUAN, C.; TALLEY, N.J.; JONES, M.P.; SPIES, J.; HOROWITZ, M. Gain and loss of gastrointestinal symptoms in diabetes mellitus: associations with psychiatric disease, glycemic control, and autonomic neuropathy over 2 years of follow-up. **Am J Gastroenterol.**, v. 103, n. 8, p. 2023-2030, 2008.

QUATRINI, M.; BOARINO, V.; GHIDONI, A.; BALDASSARRI, A.R.; BIANCHI, P.A.; BARDELLA, M.T. Helicobacter pylori prevalence in patients with diabetes and its relationship to dyspeptic symptoms. **J Clin Gastroenterol.**, v. 32, n. 3, p. 215-217, 2001.

QVIGSTAD, G.; ARNESTAD, J.S.; BRENNAN, E.; WALDUM, H.L. Treatment with proton pump inhibitors induces tolerance to histamine-2 receptor antagonists in Helicobacter pylori-negative patients. **Scand J Gastroenterol.**, v. 33, n. 12, p. 1244-1248, 1998.

RABON, E.; CUPPOLETTI, J.; MALINOWSKA, D.; SMOLKA, A.; HELANDER, H.F.; MENDLEIN, J.; SACHS, G. Proton secretion by the gastric parietal cell. **J Exp Biol.**, v. 106, p. 119-133, 1983.

RAMSAY, P.T.; CARR, A. Gastric acid and digestive physiology. **Surg Clin North Am.**, v. 91, n. 5, p. 977-982, 2011.

RASKIN, I.; RIBNICKY, D.M.; KOMARNYTSKY, S.; ILIC, N.; POULEV, A.; BORISJUK, N.; BRINKER, A.; MORENO, D.A.; RIPOLL, C.; YAKOBY, N.; O'NEAL, J.M.; CORNWELL, T.; PASTOR, I.; FRIDLENDER, B. Plants and human health in the twenty-first century. **Trends Biotechnol.**, v. 20, n. 12, p. 522-531, 2002.

RAUFMAN, J.P. Peptic activity and gastroduodenal mucosal damage. **Yale J Biol Med.**, v. 69, n. 1, p. 85-90, 1996.

RATES, S.M. Plants as source of drugs. **Toxicon.**, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.

READ, N.W.; HOUGHTON, L.A. Physiology of gastric emptying and pathophysiology of gastroparesis. **Gastroenterol Clin North Am.**, v. 18, n. 2, p. 359-373, 1989.

REIS, J.S.; VELOSO, C.A.; MATTOS, R.T.; PURISH, S.; NOGUEIRA-MACHADO, J.A. Oxidative stress: a review on metabolic signaling in type 1 diabetes. **Arq Bras Endocrinol Metabol.**, v. 52, n. 7, p. 1096-1105, 2008.

REPETTO, M. G.; LLESUY, S. F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Braz.J.Med.Biol.Res.**, v. 35, n. 5, p. 523-534, 2002.

ROBERT, A. ; NEZAMIS, J.E.; LANCASTER, C.; HAUCHAR, A.J. Cytoprotection by prostaglandins in rats: Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. **Gastroenterology**, v.77, p.433-443, 1979.

ROBERTSON, M.S.; CLANCY, R.L.; CADE, J.F. Helicobacter pylori in intensive care: why we should be interested. **Intensive Care Med.**, v. 29, n. 11, p. 1881-1888, 2003.

RODRIGUES, M.L.; MOTTA, M.E. Mechanisms and factors associated with gastrointestinal symptoms in patients with diabetes mellitus. **J Pediatr.**, v. 88, n. 1, p. 17-24, 2012.

ROSSETTI, P.; PAMPANELLI, S.; FANELLI, C.; PORCELLATI, F.; COSTA, E.; TORLONE, E.; SCIONTI, L.; BOLLI, G.B. Intensive Replacement of Basal Insulin in Patients With Type 1 Diabetes Given Rapid-Acting Insulin Analog at Mealtime: A 3-month comparison between administration of NPH insulin four times daily and glargine insulin at dinner or bedtime. **Diabetes Care.**, v. 26, n. 5, p. 1490-1496, 2003.

ROSTAS, J.W. 3RD.; MAI, T.T.; RICHARDS, W.O. Gastric motility physiology and surgical intervention. **Surg Clin North Am.**, v. 91, n. 5, p. 983-99, 2011.

SALTIER, A.R. New perspectives into the molecular Pathogenesis and Treatment of type 2 Diabetes. *Cell*, v. n.23, p.517-529, fev.2001.

SAMSOM, M.; ROELOFS, J.M.; AKKERMANS, L.M.; VAN BERGE HENEGOUWEN, G.P.; SMOUT, A.J. Proximal gastric motor activity in response to a liquid meal in type I diabetes mellitus with autonomic neuropathy. **Dig Dis Sci.**, v. 43, n. 3, p. 491-496, 1998.

SANAKA, M.; YAMAMOTO, T.; KUYAMA, Y. Effects of proton pump inhibitors on gastric emptying: a systematic review. **Dig Dis Sci.** , v. 55, n. 9, p. 2431-2440, 2010.

SANTINI, S.A.; MARRA, G.; GIARDINA, B.; COTRONEO, P.; MORDENTE, A.; MARTORANA, G.E.; MANTO, A.; GHIRLANDA, G. Defective plasma antioxidant defenses and enhanced susceptibility to lipid peroxidation in uncomplicated IDDM. **Diabetes.** v. 46, n. 11, p. 1853-1858, 1997.

SARGÝN, M.; UYGUR-BAYRAMICLI, O.; SARGÝN, H.; ORBAY, E.; YAVUZER, D.; YAYLA, A. Type 2 diabetes mellitus affects eradication rate of Helicobacter pylori. **World J Gastroenterol.**, v. 9, n.5, p. 1126-1128, 2003.

SATOH, H.; ASANO, S.; MAEDA, R.; MURAKAMI, I.; INADA, I.; SATO, F.; SHINO, A. Prevention of gastric ulcer relapse induced by indomethacin in rats by a mutein of basic fibroblast growth factor. **Jpn J Pharmacol.**, v. 73, n.3, p. 229-241, 1997.

SBD. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: tratamento e acompanhamento do diabetes mellitus. Rio de Janeiro: SBD, 2014.

SBD. Consenso Brasileiro sobre Diabetes 2002: diagnóstico e classificação do diabetes mellitus e tratamento do diabetes mellitus tipo 2. Rio de Janeiro: Diagraphic editora, 2003.

SBOLLI, K. C. *Arctium lappa*: Efeitos depressores do sistema nervoso central em roedores. Curitiba. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2003.

SCARPIGNATO, C.; CAPOVILLA, T.; BERTACCINI, G. Action of caerulein on gastric emptying of the conscious rat. **Arch Int Pharmacodyn Ther.**, v. 246, n. 2, p. 286-294, 1980.

SCHERER-SINGLER, U.; VINCENT, S.R.; KIMURA, H.; MCGEER, E.G. Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. **J Neurosci Methods.**, v.9, n.3, p. 229-234, 1983

SCHUARTSMAN, S. **Produtos químicos de uso domiciliar: segurança e riscos toxicológicos**. São Paulo: Almed, 1980, p. 92.

SCHUBERT, M.L. Gastric secretion. **Curr Opin Gastroenterol.** , v. 21, n. 6, p. 636-643, 2005.

SCHUBERT, M.L.; PEURA, D.A. *Control of gastric acid secretion in health and disease*. **Gastroenterology.** , v.134, n.7, p.1842-1860, 2008

SCHVARCZ, E.; PALMÉR, M.; AMAN, J.; HOROWITZ, M.; STRIDSBERG, M.; BERNE C. Physiological hyperglycemia slows gastric emptying in normal subjects and patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **Gastroenterology.**, v. 113, n. 1, p. 60-66, 1997.

SEDLAK, J., LINDSAY, R.H. Estimation of total prote in bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry.**, v. 25, 192–205, 1968.

SILVER, A. A.; KRANTZ J. C. JR. The effect of the ingestion of burdock root on normal and diabetic individuals: a preliminary report. **Annals of Internal Medicine**, v. 5, p. 274-284, 1931.

SIMÕES, C. M. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**.6. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2004

SIRAKI,A.G.;POURAHMAD,J.; CHAN,T.S.;KHAN,S.; O'BRIEN,P.J. Endogenous and endobiotic induced reactive oxygen species formation by isolated hepatocytes. **Free Radical Biol. Med.**, v.32, p. 2-10, 2002.

SOUZA, L.M.; DARTORA, N.; SCOPARO, C.T.; CIPRIANI, T.R.; GORIN, P.A.; IACOMINI, M.; SASSAKI, G.L.Comprehensive analysis of maté (*Ilex paraguariensis*) compounds: development of chemical strategies for matesaponin analysis by mass spectrometry. **J Chromatogr A.**, v. 1218, n. 41, p. 7307-7315, 2011.

SHARMA, M.; RAI, K.; SHARMA, S.S.; GUPTA, Y.K. Effect of antioxidants on pyrogallol-induced delay in gastric emptying in rats. **Pharmacology.**, v. 60, n. 2, p. 90-96, 2000.

SHAY, H. A simple for the uniform production of gastric ulceration in rat. **Gastroenterology.**, v. 5, p. 43-61, 1945.

SHEEN, E.; TRIADAFILOPOULOS, G. Adverse effects of long-term proton pump inhibitor therapy. **Dig Dis Sci.**, v. 56, n. 4, p. 931-950, 2011.

SINGH, R.; BARDEN, A.; MORI, T.; BEILIN, L. Advanced glycation end-products: a review. **Diabetologia.**, v. 44, n. 2, p. 129-146, 2001.

STITT, A.W.; CURTIS, T.M. Advanced glycation and retinal pathology during diabetes. **Pharmacol Rep.**, v. 57, p. 156-168, 2005.

STOLTE, M.; BETHKE, B.; RÜHL, G.; RITTER, M. Omeprazole-induced pseudohypertrophy of gastric parietal cells. **Z Gastroenterol.**, v. 30, n. 2, p. 134-138, 1992.

SUSANTI, S.; IWASAKI, H.; INAFUKU, M.; TAIRA, N.; OKU, H. Mechanism of arctigenin-mediated specific cytotoxicity against human lung adenocarcinoma cell lines. **Phytomedicine.**, v. 21, n. 1, p. 39-46, 2013.

SUZUKI, K.; ARAKI, H.; KOMOIKE, Y.; TAKEUCHI, K. Permissive role of neutrophils in pathogenesis of indomethacin-induced gastric lesions in rats. **Med Sci Monit.**, v. 6, n. 5, p. 908-914, 2000.

SPICER, Z.; MILLER, M.L.; ANDRINGA, A.; RIDDLE, T.M.; DUFFY, J.J.; DOETSCHMAN, T.; SHULL, G.E. Stomachs of mice lacking the gastric H,K-ATPase alpha-subunit have achlorhydria, abnormal parietal cells, and ciliated metaplasia. **J Biol Chem.**, v. 275, n. 28, p. 21555-21565, 2000.

SZABO, S., TRIER, J.S., BROWN, A., SCHNOOR, J. (1985). "Early vascular injury and increased vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat. **Gastroenterology** 88: 228-236.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas., v. 50, n. 6, p. 537-546, 2001.

TACK, J.; BISSCHOPS, R.; SARNELLI, G. Pathophysiology and treatment of functional dyspepsia. **Gastroenterology.**, v. 127, n. 4, p. 1239-1255, 2004.

TACK, J. Gastric motor disorders. **Best Pract Res Clin Gastroenterol.**, v. 21, n. 4, p. 633-644, 2007.

TACK, J. Prokinetics and fundic relaxants in upper functional GI disorders. **Curr Opin Pharmacol.**, v. 8, n. 6, p. 690-696, 2008.

TACK, J.; TALLEY, N.J.; CAMILLERI, M.; HOLTMANN, G.; HU, P.; MALAGELADA, J.R.; STANGHELLINI, V. Functional gastroduodenal disorders. **Gastroenterology.**, v. 130, n. 5, p. 1466-1479, 2006.

TAKAGI, E.; OKABE, S.; SAZIKI, R. A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and effect of several drugs on healing. **Japanese Journal of Pharmacology.** v. 19, p. 416-426, 1969.

TAKAGI, T.; NAITO, Y.; OYA-ITO, T.; YOSHIKAWA, T. The role of methylglyoxal-modified proteins in gastric ulcer healing. **Curr Med Chem.**, v. 19, n. 1, p. 137-144, 2012.

TAKAHASHI, T. Pathophysiological significance of neuronal nitric oxide synthase in the gastrointestinal tract. **J Gastroenterol.**, v. 38, n. 5, p. 421-430, 2003.

TAKAHASHI, T., NAKAMURA, K.; ITOH, H.; SIMA, A.A.; OWYANG, C. Impaired expression of nitric oxide synthase in the gastric myenteric plexus of spontaneously diabetic rats. **Gastroenterology.**, v. 113, n.5, p. 1535-1544, 1997.

TAKEUCHI, K.; OKADA, M.; NIIDA, H.; OKABE, S. Role of sulfhydryls in mucosal injury caused by ethanol: relation to microvascular permeability, gastric motility and cytoprotection. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 248, n. 2, p. 836-841, 1989.

TAKEUCHI, K.; TAKEHARA, K.; TAJIMA, K.; KATO, S.; HIRATA, T. Impaired healing of gastric lesions in streptozotocin-induced diabetic rats: effect of basic fibroblast growth factor. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 281, p. 200-207, 1997.

TALLEY, N.J.; VERLINDEN, M.; GEENEN, D.J.; HOGAN, R.B.; RIFF, D.; MCCALLUM, R.W.; MACK, R.J. Effects of a motilin receptor agonist (ABT-229) on upper gastrointestinal symptoms in type 1 diabetes mellitus: a randomised, double blind, placebo controlled trial. **Gut.**, v. 49, n. 3, p. 395-401, 2001.

TANDON, R.,; KHANNA, H.D.; DORABABU, M.; GOEL, R.K. Oxidative stress and antioxidants status in peptic ulcer and gastric carcinoma. **Indian J Physiol Pharmacol.**, v. 48, n. 1, p. 115-118, 2004.

TANG, R.S.; CHAN, F.K. Therapeutic management of recurrent peptic ulcer disease. **Drugs.**, v. 72, n. 12, p. 1605-1616, 2012.

TARNAWSKI, A.; STACHURA, J.; KRAUSE, W.J.; DOUGLASS, T.G.; GERGELY, H. Quality of gastric ulcer healing: a new, emerging concept. **J Clin Gastroenterol.** 1991

TARNAWSKI, A.S. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. **Dig Dis Sci.**, v. 50, n. 1, p. S24-S33, 2005.

TARNAWSKI, A.S.; TOMIKAWA, M.; OHTA, M.; SARFEH, I.J. Antacid talcid activates in gastric mucosa genes encoding for EGF and its receptor. The molecular basis for its ulcer healing action. **J Physiol Paris.**, v. 94, n.2, p. 93-98, 2000.

TASHIMA, K.; FUJITA, A.; TAKEUCHI, K. Aggravation of ischemia/reperfusion-induced gastric lesions in streptozotocin-diabetic rats. **Life Sci.**, v. 67, n. 14, p. 1707-1718, 2000.

TAY, S.S.; WONG, W.C. Short- and long-term effects of streptozotocin-induced diabetes on the dorsal motor nucleus of the vagus nerve in the rat. **Acta Anat.**, v. 150, n.4, p. 274-281, 1994.

TEZUKA, Y.; YAMAMOTO, K.; AWALE, S.; LIA, F.; YOMODA, S.; KADOTA, S. Anti-austeric activity of phenolic constituents of seeds of *Arctium lappa*. **Nat Prod Commun.**, v. 8, n. 4, p. 463-466, 2013.

TRICHES, C.; SCHAAN, B.D.; GROSS, J.L.; AZEVEDO, M.J. Macrovascular diabetic complications: clinical characteristics, diagnosis and management. **Arq Bras Endocrinol Metabol.**, v. 53, n. 6, p. 698-708, 2009.

TSENG, P.H.; LEE, Y.C.; CHIU, H.M.; CHEN, C.C.; LIAO, W.C.; TU, C.H.; YANG, W.S.; WU, M.S. Association of diabetes and HbA1c levels with gastrointestinal manifestations. **Diabetes Care.**, v. 35, n. 5, p. 1053-1060, 2012.

URUSHIDANI, T.; MUTO, Y.; NAGAO, T.; YAO, X.; FORTE, J.G. ME-3407, a new antiulcer agent, inhibits acid secretion by interfering with redistribution of H(+)-K(+)-ATPase. **Am J Physiol.**, v. 272, n. 5 Pt 1, p. G1122-G1134, 1997.

VASCONCELOS, P.C.; KUSHIMA, H.; ANDREO, M.; HIRUMA-LIMA, C.A.; VILEGAS, W.; TAKAHIRA, R.K.; PELLIZZON, C.H. Studies of gastric mucosa regeneration and safety promoted by Mouriri pusa treatment in acetic acid ulcer model. **J Ethnopharmacol.**, v. 115, n. 2, p. 293-301, 2008.

VELO, G.P.; MINUZ, P.; RIELA, A.; BROCCO, G.; DEGAN, M.; FRANCO, L.; CAVALLINI, G. Gastric and systemic effects of carbenoxolone and its derivative ISF 2715 in humans. **Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res.**, 1987

VENKATARANGANNA, M.V.; GOPUMADHAVAN, S.; SUNDARAM, S.K.; MITRA. Evaluation of possible mechanism of anti-ulcerogenic activity of UL 409, a herbal preparation. **Journal of Ethnopharmacology**, v.63, p. 187-192, 1998.

VINIK, A.I.; ZIEGLER, D. Diabetic cardiovascular autonomic neuropathy. **Circulation.**, v. 115, n. 3, p. 387-397, 2007.

VLIETINCK, A.J.; DE BRUYNE, T.; APERS, S.; PIETERS, L.A. Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. **Planta Med.**, v. 64, n.2, p. 97-109, 1998.

WALLACE, J. Mechanisms of Protection and Healing: Current Knowledge and Future Research. **Am J Med**, v.110, p. 19S-23S, 2001.

WALLACE, J.L. Recent advances in gastric ulcer therapeutics. **Curr Opin Pharmacol.**, v.5, n.6, p. 573-577, 2005.

WALSH, J.H. Role of gastrin as a trophic hormone. **Digestion.**, v. 47, n. 1, p. 11-16; discussion 49-52, 1990.

WANG, G.Z.; HUANG, G.P.; YIN, G.L.; ZHOU, G.; GUO, C.J.; XIE, C.G.; JIA, B.B.; WANG, J.F. Aspirin can elicit the recurrence of gastric ulcer induced with acetic acid in rats. **Cell Physiol Biochem.**, v. 20, n. 1-4, p. 205-212, 2007.

WANG, H.Q.; JIN, J.J.; WANG, J. Arctigenin enhances chemosensitivity to cisplatin in human nonsmall lung cancer H460 cells through downregulation of survivin expression. **J Biochem Mol Toxicol.**, v. 28, n.1, p. 39-45, 2014..

WANG, Y.; MARSDEN, P.A. Nitric oxide synthases: biochemical and molecular regulation. **Curr Opin Nephrol Hypertens.**, v. 4, n. 1, p. 12-22, 1995.

WANG, X.; LI, F.; SUN, Q.; YUAN, J.; JIANG, T.; ZHENG, C. Application of preparative high-speed counter-current chromatography for separation and purification of arctiin from Fructus Arctii. **Journal of Chromatography A**, v. 1063, p. 247-251, 2005.

WILLIAMSON, J.R.; CHANG, K.; FRANGOS, M.; HASAN, K.S.; IDO, Y.; KAWAMURA, T.; NYENGAARD, J.R.; VAN-DEN ENDEN, M.; KILO, C.; TILTON, R.G. Hyperglycaemic pseudohypoxia and diabetics complications. **Diabetes.**, v. 42, p. 801-808, 1993.

WOOD, D.; Neurogastroenterology and Gastrointestinal Motility Jackie. In: Gastrintestinal physiology. Disponível em: <
<http://faculty.ksu.edu.sa/15218/Medical%20Books/Medical%20Physiology%202nd%202003%20Rhoades/Medical%20Physiology%202nd%202003%20Rhoades/smch26.pdf>>. Acesso em : 30/05/2014.

WU, J.G.; WU, J.Z.; SUN, L.N.; HAN, T.; DU, J.; YE, Q.; ZHANG, H.; ZHANG, Y.G. Ameliorative effects of **arctiin** from *Arctium lappa* on experimental glomerulonephritis in rats. **Phytomedicine.**, v. 16, n.11, p. 1033-1041, 2009.

XU, J.G.; HU, Q.P.; LIU, Y. Antioxidant and DNA-protective activities of chlorogenic acid isomers. **J Agric Food Chem.**, v. 60, n. 46, p. 11625-11630, 2012.

XU, Z.; JU, J.; WANG, K.; GU, C.; FENG, Y. Evaluation of hypoglycemic activity of total lignans from Fructus Arctii in the spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rats. **J Ethnopharmacol.**, v. 151, n.1, p. 548-555, 2014.

XU, Z. H.; WANG, X. Y.; ZHOU, M. M.; DENG, Y.; ZHANG, H.; ZHAO, A.; ZHANG, Y.; JIA, W. The antidiabetic activity of total lignan from Fructus Arctii against alloxan-induced diabetes in mice and rats. **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 97–101, 2008.

YAMAGISHI, S. Role of advanced glycation end products (AGE) and soluble receptor for AGE (sRAGE) in vascular complications in diabetes. **Nihon Rinsho.**, v.70, n. 5, p. 243-247, 2012.

YILMAZ-OZDEN, T.; KURT-SIRIN, O.; TUNALI, S.; AKEV, N.; CAN, A.; YANARDAG, R. Ameliorative effect of vanadium on oxidative stress in stomach tissue of diabetic rats. **Bosn J Basic Med Sci.**, v. 14, n. 2, p. 105-109, 2014.

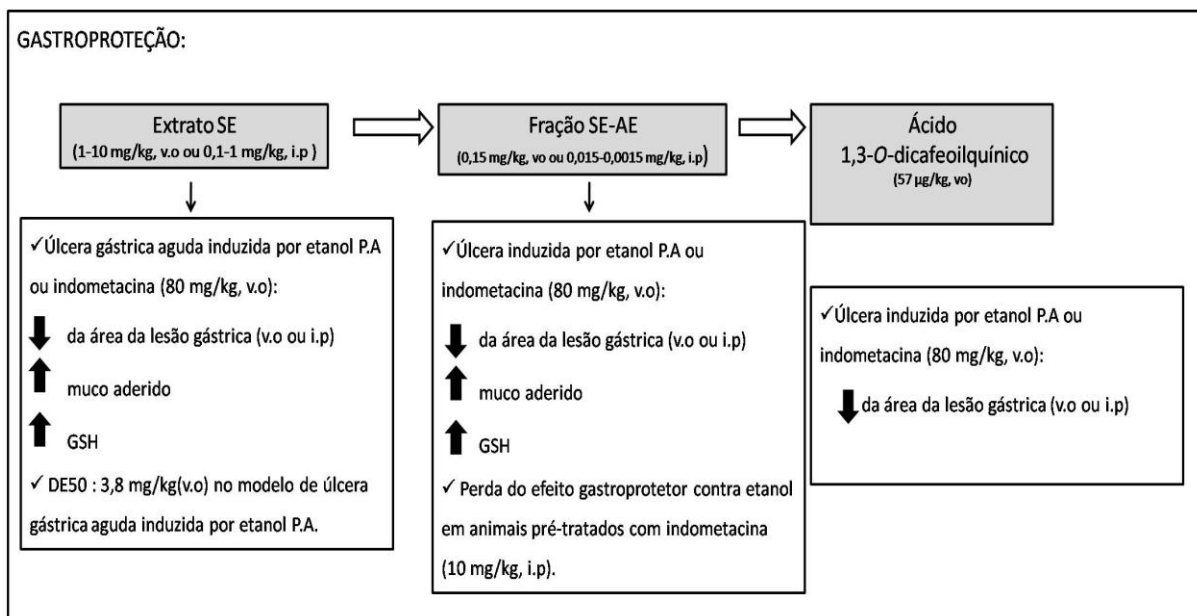
YUAN, Y.; PADOL, I.T.; HUNT, R.H. Peptic ulcer disease today. **Nature Clin Pract. Gastroent & Hepat.**, v. 3, n.2, 2006.

ZANDECKI, M.; VANDEN BERGHE, P.; DEPOORTERE, I.; GEBOES, K.; PEETERS, T.; JANSSENS, J.; TACK, J. Characterization of myenteric neuropathy in the jejunum of spontaneously diabetic BB-rats. **Neurogastroenterol Motil.**, v. 20, n. 7, p. 818-28., 2008.

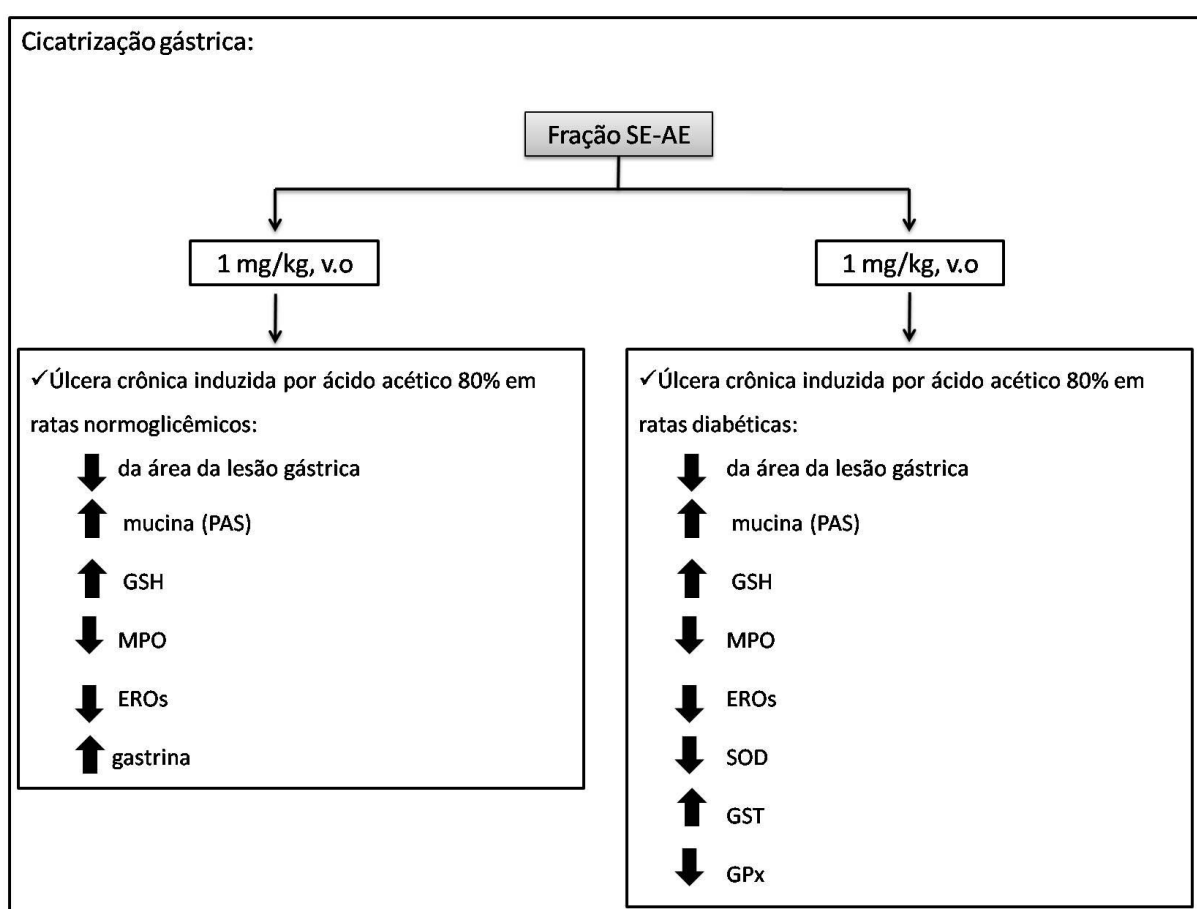
ZHAO, F., WANG, L., LIU, K. In vitro anti-inflammatory effects of arctigenin, a lignan from *Arctium lappa* L., through inhibition on iNOS pathway. **J Ethnopharmacol.**, v.21, p. 457-462, 2009.

8. APÊNDICES

8.1 Apendice A : Representação esquemática dos principais resultados obtidos nos ensaios de gastroproteção



8.2 Apendice B : Representação esquemática dos principais resultados obtidos nos ensaios de cicatrização gástrica



8.3 Apendice C : Representação esquemática dos principais resultados obtidos nos ensaios de motilidade gástrica

